
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

Étude de quelques modes de neutralisation des toxines bactériennes.

PAR A. MARIE ET M. TIFFENEAU.

I

L'une des toxines bactériennes qui se prête le mieux à l'étude des phénomènes de neutralisation est la toxine tétanique, tant à cause des réactions caractéristiques qu'elle provoque chez les mammifères qu'en raison de l'affinité élective qu'elle manifeste *in vitro* pour la substance nerveuse de ces animaux. A côté de ce mode de neutralisation, propre à la toxine du tétanos et à celle du botulisme, il en est d'autres d'un caractère plus général, qui ont été également l'objet de nos recherches et feront l'objet d'un autre mémoire.

NEUTRALISATION PAR LA SUBSTANCE CÉRÉBRALE

On sait que la substance cérébrale possède vis-à-vis de la tétanotoxine une action à la fois neutralisante et fixatrice ¹. Emulsionnée dans un liquide renfermant une quantité convenable de toxine, la matière cérébrale du cobaye peut, en vertu d'une adsorption particulière, dépouiller la solution de la totalité de son poison : une partie aura été *neutralisée* à la façon des combinaisons chimiques, stables, l'autre se sera *fixée* à la manière des teintures sur les textiles. Physiologiquement, cette double action est ainsi caractérisée : par son pouvoir *neutralisant*, le cerveau rend la toxine tétanique inoffensive pour l'organisme qui a reçu l'émulsion, tandis que ce dernier réagit spécifiquement en présence d'une substance ayant seulement *fixé* le poison.

1. Ces deux qualificatifs sont employés souvent l'un pour l'autre ; nous les conserverons, faute de termes plus suggestifs, mais en attribuant à chacun d'eux un sens spécial.

L'étude du phénomène de *neutralisation*, le seul qui nous intéresse ici, comporte au moins deux points : la toxine tétanique est-elle détruite ou combinée, autrement dit, est-il possible de libérer le poison dans un mélange neutre cerveau-toxine ? Cette question une fois résolue, nous aurons à donner une interprétation de la nature de cette neutralisation de la tétanotoxine par la substance cérébrale.

1. *Mise en liberté de la toxine tétanique après sa neutralisation.*
L'action neutralisante a pour caractère essentiel de dépendre, en majeure partie, de la teneur en eau de constitution de la matière cérébrale. L'un de nous ¹ a montré qu'après dessiccation dans le vide, cette substance a perdu les 97 p. 0/0 de son pouvoir neutralisant, ce qui en reste ne paraissant pas notablement influencé par la chaleur sèche de 60, 100 et 126°.

Comme conséquence de ce phénomène, nous nous sommes demandé si la privation d'eau dans un mélange neutre cerveau-toxine ne suffirait pas pour libérer le poison, au moins partiellement.

EXPÉRIENCE I. — Un encéphale de cobaye, du poids de 3^{gr},40, est broyé et émulsionné dans 60 doses mortelles pour la souris de toxine tétanique (0,03 c. c.), diluées dans 10 c. c. d'eau physiologique. Après 15 heures à la glacière, on centrifuge et on dessèche à la machine pneumatique 1/4 du dépôt que l'on fait macérer 5 heures dans 3 c. c. d'eau distillée.

ACTION DE LA DESSICCATION *in vitro*

12 février.	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Souris 1. Liquide centrifugé, 1 c. c.	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Souris 2. Dépôt centrifugé, 0,25 c. c.	0	0	0	0	0	—	—	—	—
Souris 3. Liquide de macération de 1/4 du dépôt desséché, 1,50 c. c.	=	≡	≡	+					

Ainsi, tandis que dans le mélange neutre cerveau-toxine, l'injection du dépôt ou du liquide a provoqué seulement une légère roideur de la patte, l'inoculation du liquide de macéra-

1. MORAX et MARIE, Note sur les propriétés fixatrices de la substance cérébrale desséchée, *C. R. Soc. Biol.*, 27 décembre 1902.

tion de 1/4 du même dépôt desséché a donné à la souris un tétanos mortel en 4 jours. La privation d'eau a suffi pour libérer dans ce mélange 8 doses mortelles de toxine tétanique, ce qui nous montre dès maintenant l'importance du rôle de l'eau dans la constitution de la substance combinée au poison.

En se reportant aux propriétés générales des albuminoïdes qui, sous l'influence de la dessiccation, se coagulent et perdent leurs principaux caractères chimiques, on est conduit naturellement à se demander si, dans le cerveau des mammifères, la substance neutralisante ne serait pas elle-même de nature albuminoïde, et, dans ce cas, si l'addition d'une diastase protéolytique à un mélange neutre cerveau-toxine ne suffirait pas pour libérer la tétanotoxine.

Après avoir essayé, sans résultat satisfaisant, divers ferments tels que la trypsine, nous avons employé, dans les expériences qui suivent, la *papaïne* (Merck ¹).

EXPÉRIENCE II. — On broye et émulsionne 2 grammes de cerveau de cobaye avec 5 doses mortelles de toxine tétanique, soit 0,0025 c. c. dans q. s. d'eau physiologique pour faire 6 c.c.; exposition à la température de la chambre pendant 24 heures, après quoi le mélange est centrifugé, et 1/3 du dépôt traité par 0,07 grammes de papaïne.

ACTION DE LA PAPAÏNE *in vitro*

6 mars.	7	8	9	10	11	12	13
Souris 1. Liquide centrifugé, 2 c. c.....	0	0	0	0	0	0	
Souris 2. Dépôt sans papaïne, 1/3.....	0	0	0	0	0	+	
						sans tox	
Souris 3. Dépôt traité par la papaïne, 1/3....	0	0	=	≡	≡	≡	+

Cette expérience, choisie parmi beaucoup d'autres analogues, a été répétée avec quelques modifications. Nous avons reconnu l'inutilité de faire agir la papaïne à 38° avant l'inoculation : on risque alors de détruire une partie du poison au fur et à

1. Dans nos premiers essais, nous avons utilisé un produit ancien qui avait perdu une partie de son activité. La papaïne, que la maison Merck nous a obligeamment envoyée, doit être employée après filtration, afin d'éviter les accidents sphacéliques, dus en partie à des principes non solubles.

mesure de sa libération, car la papaïne exerce sur la tétanotoxine une action destructive dont voici un exemple.

EXPÉRIENCE III. — On met à 38° le mélange :

Eau distillée 15 c. c.

Toxine tétanique 0,01 c. c. (20 doses mortelles).

Papaïne 0,30 grammes.

Après 30 minutes d'exposition à l'étuve, on filtre sur bougie, et on laisse séjourner 24 heures à la chambre, après quoi le mélange est inoculé, à la dose de 3 c. c. représentant plus de 4 doses mortelles, à une souris qui n'a offert par la suite aucun symptôme tétanique.

Cette expérience nous explique pourquoi nous n'avons jamais observé le passage de la toxine dans le liquide centrifugé des mélanges papainés.

Dans certains essais, l'injection de ce liquide a provoqué la mort plus ou moins rapide des animaux, sans tétanos : on peut supposer que dans ce cas des produits toxiques s'étaient formés soit par autolyse des cellules nerveuses, soit par action de la papaïne sur elles.

Quoi qu'il en soit, il ressort de nos expériences que la papaïne peut libérer à peu près la moitié de la toxine tétanique adsorbée par la substance nerveuse.

Ainsi, deux procédés très différents, la *dessiccation* et l'action d'une *diastase*, concordent tous les deux pour montrer que dans les mélanges neutres cerveau-toxine, celle-ci n'est pas détruite, mais est entrée dans une *combinaison* dont nous étudierons la nature.

*
* *

Il était à penser que, chez les animaux tétanisés, le poison n'est pas détruit entièrement, mais se combine en partie dans l'intimité du tissu nerveux¹. Dans cette hypothèse, l'un des deux procédés que nous venons d'indiquer serait-il applicable à la recherche de la tétanotoxine dans les centres nerveux des animaux morts du tétanos? Il faut se rappeler toutefois qu'il n'y a pas analogie complète entre l'adsorption du poison tétanigène par la cellule vivante et la neutralisation de celui-ci *in vitro*; que d'autre part, la quantité de toxine fixée pendant la maladie doit être tout à fait minime.

1. Nous rappellerons qu'après la mort, on peut extraire la toxine tétanique des trones nerveux, mais non des substances médullaire et cérébrale. Cf. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XI et XVI.

EXPÉRIENCE IV. — On inocule, dans les muscles d'une patte d'un cobaye de 595 grammes, environ 100 doses mortelles, soit 1 c. c. de toxine tétanique, à la suite de quoi l'animal succombe dans la nuit. Le bulbe est broyé et desséché dans le vide; la poudre est délayée dans 2 c. c. d'eau distillée et l'émulsion inoculée à une souris.

ACTION DE LA DESSICCATION SUR LE BULBE D'UN ANIMAL TÉTANISÉ

16 février.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Souris 1. Émulsion du bulbe non desséché, 0,50 c. c.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Souris 2. Liquide de macération du bulbe desséché, 2 c. c.....			0	0	—	—	—	—	—	—	—

Mais si, au lieu d'injecter la toxine dans les muscles d'un animal aussi sensible que le cobaye, on l'inocule dans le sang du lapin, très peu sensible à la tétanotoxine, le poison fixé ne peut être mis en évidence au moyen de la dessiccation, parce que l'injection intraveineuse a eu pour résultat de répartir sur toute la surface de l'axe cérébro-spinal la faible portion de toxine qui avait échappé aux effets de l'immunité naturelle du lapin; car on sait que l'inoculation intraveineuse provoque un tétanos général d'emblée.

EXPÉRIENCE V. — Un lapin de 2,920 grammes succombe au tétanos généralisé, 36 heures environ après une injection de 20 c. c. de toxine tétanique dans la veine auriculaire : le bulbe est desséché dans le vide.

ACTION DE LA DESSICCATION SUR LE BULBE D'UN ANIMAL TÉTANISÉ

16 février.	17	18	19	20	21	22	23	24
Souris 1. Bulbe non desséché, 0,50 gr.....	0	0	0	0	0	0	0	0
Souris 2. Sérum sanguin, 0,50 c. c.....		0	—	—	—	—	—	+
Souris 3. Eau de macération du bulbe desséché, 3 c. c.			0	0	0	0	0	0

Le procédé de la dessiccation a donc réussi seulement dans le cas d'inoculation intramusculaire et chez le cobaye; quant à l'em-

ploi de la papaine, il ne nous a pas permis d'extraire la toxine tétanique du cerveau des animaux inoculés dans le sang ou sous la peau avec des doses même plus fortes que dans les expériences précédentes. Ainsi, traité par la papaine, le bulbe d'un cobaye, injecté avec 300 doses mortelles dans les muscles, a déterminé chez la souris seulement un très léger tétanos local.

Pour parvenir à isoler, à l'aide de la dessiccation ou de la papaine, le poison dans les centres nerveux, il faut l'y introduire directement.

EXPÉRIENCE VI. — Deux cobayes, après avoir reçu 0,05 c. c. de toxine dans le cerveau, succombent au tétanos cérébral en l'espace de 12 heures environ. L'encéphale du premier est broyé et mis sous le vide pneumatique. Une moitié du cerveau du second est broyée et additionnée de 0,02 grammes de papaine, l'autre moitié de 0,20 grammes. Étuve pendant 30 minutes.

ACTION DE LA DESSICCATION ET DE LA PAPAÏNE APRÈS TÉTANOS CÉRÉBRAL

20 février.	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Souris 1. Cerveau non desséché, 0,50 gr.	O	O	O	O	—	—	—	—	
Souris 2. Liquide de macération du cerveau desséché, 4 c. c.		O	—	=	≡	≡	≡	≡	+
27 février.	28	1	2	3	4	5	6	7	8
Souris 3. Cerveau non papainé.....		O	O	O	O	O	O	O	O
Souris 4. Cerveau + 0,02 gr. papaine..		—	—	—	—	=	=	=	=
Souris 5. Cerveau + 0,20 gr. papaine (a).		O	O	O	O	O	O	O	+
									SANS 108

Si, après l'introduction de la toxine au sein des cellules nerveuses, on peut l'y retrouver facilement, la raison en est que le poison, grâce à son affinité pour la substance cérébrale, s'y est localisé, échappant ainsi à la destruction de nature complexe qui suit tout autre mode d'inoculation.

Ces expériences *in vivo* concordent dans une certaine mesure

(a) L'absence de tout signe tétanique chez cette souris est due à l'excès de papaine, qui a détruit la toxine.

avec nos recherches *in vitro*, pour montrer que la tétanotoxine n'est pas non plus détruite dans le tissu nerveux des animaux vivants, mais y contracte une combinaison stable qu'on ne peut dissocier sans détruire l'un des constituants.

Nous ferons remarquer encore que la toxine ainsi extraite du cerveau chez l'animal tétanisé manifeste, vis-à-vis de l'organisme des mammifères, des propriétés absolument *identiques* à celles qu'elle offrait avant d'avoir contracté la combinaison *in vivo*. Une telle constatation est loin d'être favorable à l'hypothèse d'après laquelle le poison tétanique élaborerait, aux dépens de certaines cellules de l'organisme, une substance immédiatement tétanisante et comparable par ses effets à un alcaloïde tel que la strychnine. Au contraire, le tétanos provoqué par la toxine extraite du cerveau des animaux ne manque jamais de présenter la même *incubation* que la maladie naturelle, incubation qui n'offre d'ailleurs rien de surprenant, si l'on veut bien se rappeler qu'une action diastasique est toujours fonction du temps.

2. *Nature de la substance qui neutralise la toxine tétanique dans le cerveau.* Après avoir montré que cette neutralisation consiste en une combinaison, essayons de préciser la nature de la substance qui dans les centres nerveux s'unit au poison tétanique.

Nous avons déjà rappelé qu'elle est assez fragile pour être détruite par privation d'eau, et, pour cette raison, nous avons présumé de sa nature *albuminoïde*.

On sait en effet que la dessiccation provoque une *coagulation* qui fait perdre leurs principales propriétés aux albuminoïdes. La chaleur étant également susceptible de déterminer un processus analogue, nous avons étudié le pouvoir neutralisant de la substance cérébrale préalablement chauffée.

EXPÉRIENCE VII. — On met au B. M. à 56° pendant 30 minutes 1,10 grammes de cerveau de cobaye, émulsionné dans 3 c. c. d'eau physiologique; ensuite on incorpore 3 doses mortelles de toxine, soit 0,0015 c. c. dans cette émulsion que l'on injecte après 24 heures de séjour à la chambre.

La souris présente au troisième jour un début de tétanos auquel elle succombe au cinquième. On voit donc que l'action de la chaleur est favorable à l'hypothèse d'une substance neutralisante albuminoïde.

Cette neutralisation est-elle équivalente à la fixation des

diastases protéolytiques par les albuminoïdes? Würtz a montré en effet que la digestion de la fibrine par la papaïne se fait en deux temps, le premier consistant en une fixation du ferment. On pouvait se demander si, dans l'adsorption d'une toxine, le premier acte ne serait pas un phénomène de même ordre et rechercher ce qui se passerait au cas où le pouvoir adsorbant de la substance nerveuse aurait été utilisé d'abord par la papaïne.

EXPÉRIENCE VIII. — On incorpore 0,20 grammes de papaïne dans 2,10 grammes de cerveau de cobaye et on ajoute q.s. d'eau physiologique pour faire 6 c.c. Après 30 minutes à l'étuve, on additionne le mélange de 5 doses mortelles de toxine tétanique, soit 0,0025 c. c. On laisse à la chambre pendant 24 heures, après quoi on centrifuge pour inoculer séparément liquide et dépôt. Une expérience de contrôle est faite avec du cerveau non papaïné.

NEUTRALISATION PAR DU CERVEAU TRAITÉ PAR LA PAPAÏNE

5 mars.	6	7	8	9	10	11	12	13
Souris 1. Emulsion papaïnée, ensuite toxinée, 0,50..	0	0	0	0	—	—	—	—
Souris 2. Emulsion non papaïnée, mais toxinée, 0,50.	0	0	0	0	0	0	0	0
Souris 3. Liquide centrifugé du cerveau papaïné et toxiné, 2 c. c.....	0	0	0	0	0	0	0	0
Souris 4. Liquide centrifugé du cerveau non papaïné, 2 c. c.....	0	0	0	0	0	0	0	0

Cette expérience montre que le traitement préalable du cerveau par la papaïne lui a retiré une partie de son pouvoir neutralisant, puisque l'animal a eu un tétanos local très net, tandis que la souris témoin n'a présenté aucune roideur tétanique. Si la toxine non neutralisée n'a pu être décelée dans le liquide centrifugé (souris 3), c'est sans doute qu'elle a été partiellement et simplement *fixée* sur le cerveau, ce qui a rendu celui-ci tétanigène, le reste du poison ayant été détruit par la papaïne en solution.

*
* *

On a voulu attribuer aussi les propriétés fixatrices du cerveau aux *corps gras* qu'il renferme. Il y avait donc lieu de rechercher si elles n'appartiendraient pas à la fois aux albuminoïdes et aux substances grasses ou même à un complexe albuminoïde grasse.

En admettant que les corps gras du cerveau — par leur fonction éthers de la glycérine — jouent, soit directement, soit sous forme de complexe organique, un rôle spécifique dans la neutralisation de la tétanotoxine, il suffira pour le savoir de saponifier ces graisses par une diastase lypolytique, telle que la *stéapsine*. Nous avons utilisé dans ce but une solution centésimale de stéapsine liquide (Grübler), après nous être assurés de l'innocuité des doses employées. Il ressort de nos essais que cette diastase hydrolysante n'a aucun pouvoir de libérer la toxine tétanique fixée sur la substance cérébrale. D'où il résulte que les corps gras du cerveau, en tant qu'éthers de la glycérine saponifiables par la stéapsine, n'exercent aucune action neutralisante sur la tétanotoxine.

Nous avons alors recherché si, privée de ses matières grasses par un solvant neutre, la substance cérébrale conserverait encore son pouvoir neutralisant. Il était tout indiqué d'employer pour cela l'éther sulfurique, privé d'alcool et saturé d'eau par agitation avec l'eau distillée (éther aqueux).

EXPÉRIENCE IX. — Un cerveau de cobaye de 3,30 grammes est divisé en deux parts dont l'une est mélangée avec 2 doses $1/2$ de toxine tétanique + 3 c.c. d'eau physiologique. Après 24 heures à la glacière, on centrifuge et inocule séparément dépôt et liquide. L'autre partie du cerveau est épuisée par l'éther aqueux, et le résidu d'évaporation de l'éther, d'un poids de 0,10 gramme est additionné de 2 doses $1/2$ de toxine.

Cette moitié de cerveau, ainsi dégraissée par l'éther, est mélangée avec 2 doses $1/2$ de tétanotoxine, laissée 24 heures à la glacière et centrifugée.

ACTION DE L'ÉTHER SUR LE POUVOIR NEUTRALISANT DU CERVEAU

7 janvier.	8	9	10	11	12	13
Souris 1. 2 doses 1/2 toxine (témoin).....	=	+				
Souris 2. Résidu d'évaporation de l'éther + 2 doses 1/2 toxine.....		=	≡	+		
Souris 3. Dépôt du cerveau-toxine non dé- graissé, 1,50 c. c.....		0	0	0	0	0
Souris 4. Liquide du cerveau-toxine non dé- graissé, 1,50 c. c.....		0	0	0	0	0
Souris 5. Liquide du cerveau toxiné et dégraissé par l'éther, 1,50 c. c.....		0	—	=	≡	≡
Souris 6. Dépôt du cerveau toxiné et dégraissé par l'éther; 1,50 c. c.....		0	0	0	—	—

On voit par cette expérience que les substances extraites du cerveau au moyen de l'éther — corps gras, lécithines, cholestérine — ne peuvent neutraliser la tétanotoxine, et cependant la substance cérébrale traitée par l'éther aqueux a perdu son pouvoir spécifique d'adsorption (souris 5), d'où il résulte que celui-ci est dû soit à des albuminoïdes perdant leurs propriétés neutralisantes après traitement par l'éther, — processus vraisemblablement coagulant, — soit à un complexe albuminoïde-graisse dissociable par l'éther et neutralisant la toxine par son groupement albuminoïde.

Malgré cela, il était indiqué d'essayer séparément l'action *in vitro* de la lécithine et de la cholestérine sur la toxine tétanique. Voici quelques essais entrepris avec chacun de ces composés :

EXPÉRIENCE X. — On abandonne à la glacière pendant 24 heures le mélange.

1°	{ Toxine tétanique.....	0,0025 c. c.
	{ Lécithine fraîche de l'œuf.....	0,25 c. c.
	{ Eau physiologique.....	Q. s. pour émulsionner.

L'émulsion de la cholestérine a été faite également dans l'eau physiologique ; cette émulsion est assez difficile à préparer ainsi, mais nous avons tenu à n'employer aucun adjuvant. Nous avons mis en tubes scellés pendant 7 jours à 38° les deux mélanges :

2°	Eau physiologique.....	0,90 c. c.
	Toxine tétanique.....	0,10 c. c.
3°	Émulsion de cholestérine.....	0,90 c. c. (environ 0,12 gr. de cholestérine).
	Toxine tétanique.....	0,10 c. c.

ACTION DE LA LÉCITHINE ET DE LA CHOLESTÉRINE SUR LA TOXINE

11 mars.	12	13	14
Souris 1. Toxine tétanique 0,0003.....	=	≡ +	
Souris 2. Mélange 1°.....		≡	≡ +
25 mars.	26	27	
Souris 3. Mélange 2° = 0,01 c. c.....	≡	+	
Souris 4. Mélange 3° = 0,01 c. c.....	≡	+	

Comme on le voit, la lécithine et la cholestérine n'ont aucune action *in vitro* sur la tétanotoxine ¹.

Nous montrerons plus tard que la neutralisation de la toxine par la *choline* et par la *névrine*, produits de dédoublement de la matière cérébrale, ne présente non plus aucune spécificité.

En résumé, nos recherches prouvent que le pouvoir neutralisant exercé sur la tétanotoxine par la substance cérébrale, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, relève de l'action de ses composés *albuminoïdes*, à l'exclusion de ses autres constituants.

13 janvier 1908.

1. La cholestérine a été employée dans le traitement du tétanos. *M. Almagia* et *G. Mendes* (Boll. d. R. Accad. med. di Roma, t. XXIII, f. 3 et 4, 1907, analysé dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur*, t. V. p. 344) rapportent deux observations de tétaniques traités, le deuxième exclusivement, par des injections de cholestérine, et finalement guéris. Nous pensons qu'il s'agit de cas de guérison spontanée: des essais nombreux sur les animaux nous ont montré que la cholestérine et la lécithine étaient dépourvues de tout pouvoir, même préventif, contre l'intoxication tétanique.

Contribution à l'étude de la flore normale des selles du nourrisson

PAR LE D^r GRÉGOIRE JACOBSON

Ancien interne des hôpitaux de Paris, docent de clinique infantile à la Faculté de médecine de Bucarest.

(Travail du laboratoire communal de la ville de Bucarest.)

Ayant entrepris, pour mon instruction personnelle, l'étude de la flore normale des selles du nourrisson, j'ai pu constater certaines particularités non décrites relatives aux formes microbiennes déjà connues, et, d'autre part, étudier quelques formes ou variétés nouvelles. Bien qu'il ne s'agisse nullement ici d'une étude complète, j'ai pensé que mes notes pourraient être utiles à ceux que cette question occupe, et c'est ce qui m'a décidé à les publier.

J'ai étudié 5 cas dont 4 de nourrissons *nourris exclusivement au sein et parfaitement bien portants*, et un de nourrisson alimenté au babeurre à cause d'accidents dyspeptiques, disparus, d'ailleurs, depuis ce mode d'alimentation.

Dans chaque cas j'ai fait des cultures en divers milieux aérobies, en milieux acides et en milieux anaérobies. L'isolement des espèces anaérobies a toujours été fait en agar profond et en suivant la technique, aujourd'hui classique, exposée dans les mémoires de *Veillon et Zuber* et dans les thèses de *Hallé, Tissier, Guillemot, Rist, Cottet*.

J'ai fait chaque fois des cultures à 20° et 2 fois des cultures à haute température : mais je n'ai pu isoler ni des espèces poussant uniquement à 20°, ni des espèces thermophiles obligatoires comme celles décrites par M^{lle} *Tsiklinsky*¹.

J'ai employé deux fois les procédés d'isolement préconisés par *Rodella*² et dans un cas j'ai pu ainsi isoler une espèce (*B. nebulosus gazogenes*) que je décrirai plus loin.

1. M^{lle} TSIKLINSKY, Sur la flore microbienne thermophile du canal intestinal de l'homme. *Ann. de l'Inst. Past.* 1903, p. 217.

2. RODELLA, Ueber anaerobe Bakterien im normalen Säuglings-stuhle. *Zeitschr. f. Hyg.*, 7 févr. 1902.

Je ne m'attarderai pas ici à la description de chaque cas en particulier, mais seulement à l'étude des espèces. J'ai trouvé la flore intestinale des nourrissons au sein sensiblement conforme à la description aujourd'hui classique de Tissier¹. *Le bacillus bifidus* prédominait dans tous les cas et paraissait, *sur les lames*, constituer la presque totalité de la flore. Les cultures m'ont permis d'isoler, en dehors des espèces coliformes, toujours présentes, *l'acidophile de Moro*, qui, contrairement à l'opinion de Tissier, paraît être constant (tout au moins à Bucarest) dans les selles du nourrisson nourri exclusivement au sein, et encore d'autres espèces, anaérobies facultatives, non encore décrites et qui méritent d'être signalées.

La flore du nourrisson au bibeurre² était très variée.

D'ailleurs, je dois répéter qu'il ne s'agissait pas, dans ce cas, d'un enfant absolument normal, car ce mode d'alimentation avait été imposé par des accidents dyspeptiques intenses, et l'enfant, quoique en apparence en bonne santé au moment de l'examen, avait encore des selles assez fétides.

De l'étude de ce cas, je tiens à relever une particularité fort intéressante, déjà énoncée par Teixeira de Mattos³ chez les enfants nourris au bibeurre : les espèces coliformes sont *uniquement* représentées par le *b. lactis aerogenes* d'Escherich. Bien que j'ai étudié un nombre considérable de colonies coliformes, il m'a été impossible d'isoler un seul colibacille. Le fait mérite d'être noté. Parmi les nombreuses espèces isolées de ce cas, je n'en décrirai qu'une seule qui m'a paru faire partie intégrante de la flore de ce nourrisson, car, dans 3 examens successifs, à plusieurs semaines de distance, je l'ai trouvée en abondance dans mes cultures.

Je diviserai cette note en 2 parties : dans une 1^{re} partie je mentionnerai quelques particularités relatives aux espèces déjà connues; dans la 2^e partie je décrirai des espèces ou variétés nouvelles.

Que MM. les professeurs Proca et Sion veuillent bien me permettre de leur témoigner ici ma reconnaissance pour l'aimable hospitalité qu'ils m'ont offerte au Laboratoire communal,

1. TISSIER, Rech. sur la flore intestinale du nourrisson, *Th. de Paris*, 1900.

2. Pour ce mode d'alimentation voir mon travail : De l'alimentation des nourrissons avec le bibeurre : *Arch. de Med. des Enfants*, janvier 1903.

3. TEIXEIRA DE MATTOS, *Jahrbuch f. Kinderh.* 1902, vol. 55, p. 55

et les bons conseils qu'ils ont bien voulu me donner dans le cours de mes recherches.

I

Bacillus bifidus (Tissier)¹. Ce bacille était de beaucoup prédominant dans les selles de nourrissons au sein. On le trouvait aussi, mais en abondance moindre, dans les selles de l'enfant au bibeurre.

L'étude que j'ai faite des divers échantillons que j'ai isolés confirme dans ses grandes lignes la description de Tissier. J'ai cependant à noter quelques particularités :

1° L'opinion de Tissier que le B. ne pousse pas en gélose acide² me paraît inexacte. Les 5 échantillons que j'ai eu entre les mains poussaient également bien sur agar sucré profond acide (4 gouttes d'acide lactique pour un tube à essai de grande dimension contenant 25 c. c. de gélose). La croissance se fait seulement un peu plus lentement que dans le même milieu non acidifié.

Si j'insiste sur ce caractère, c'est qu'il permet, dans les cas à flore complexe, d'isoler le B. assez facilement : on sait que dans les milieux acides les espèces coliformes poussent mal et, quand elles poussent, ne donnent pas ou donnent peu de gaz.

Ce caractère acidophile du B. était d'ailleurs à prévoir, étant donnée la prédominance considérable de cette espèce dans les selles du nourrisson au sein, selles dont la réaction est toujours franchement acide à l'état normal³.

2° Les colonies de B. ne sont lenticulaires qu'au début. Quand elles grandissent, on voit habituellement, sur l'une des faces de la lentille, pousser un prolongement perpendiculaire formant avec le plan de la lentille deux angles dièdres. On peut aussi voir pousser un prolongement analogue sur l'autre face : la colonie prend alors l'aspect d'une graine d'ombellifère.

Les colonies sont *compactes* : on peut les énucléer de la

1. TISSIER, *Loc. cit.*

2. *Id.*, *Id.*, p. 94.

3. Dans un récent mémoire (*Ann. de l'Inst. Past.* 1905, p. 446) Tissier considère le *Bifidus* comme un ferment très actif des sucres à acidité d'arrêt. 3,43 à 4,90 (de SO^4H^2 , p. 1,000); il reconnaît donc aussi que le *Bifidus* pousse en milieu acide.

gélose comme un bourbillon, ou encore les couper au bistouri sans les déformer — contrairement à d'autres colonies (entérocoque, par exemple) qui, piquées, se vident comme une poche remplie de liquide.

Les colonies de B. sont composées d'une masse granuleuse qui s'émulsionne très mal.

3° Sur agar sucré profond, coloré par le vert de malachite (3 gouttes d'une solution à 1 0/0 de vert malachite dans un tube de 30 c. c. d'agar), le B. ne pousse pas : ce procédé ne peut donc convenir pour les isollements.

4° Après divers essais, le milieu de culture *liquide de choix* m'a paru être le bouillon ordinaire auquel on ajoute, pour un tube à essai habituel (8-10 c. c. de bouillon), 2 c. c. d'une solution de glycose à 10 0/0 et 1 c. c. de lait.

Dans ce milieu la culture est rapide et abondante. Au bout de quelques jours, quand le milieu s'acidifie, le lait en suspension est coagulé et se précipite en flocons au fond du tube.

Il est intéressant de noter que, dans 3 essais successifs, j'ai obtenu des cultures *bien plus rapides et plus abondantes* en me servant, pour la préparation du milieu, de lait de femme stérilisé au lieu de lait de vache. Le fait mérite d'être encore vérifié.

5° Je n'ai pu faire pousser le B. ni sur gélatine ou agar à 20° ni sur agar sucré ou en milieu liquide à 45-50°.

6° Comme Tissier, je considère le B. comme un bacille strictement anaérobie quand il est pur; en symbiose il pousse parfois, quoique faiblement, même en milieux aérobies).

Mes recherches contredisent donc celles de *Passini*¹ qui affirme que le B. de Tissier pousse abondamment *en surface* sur agar sucré, même si l'anaérobiose est incomplète.

BACILLUS ACIDOPHILUS. — (*Moro*²), *Tissier* affirme qu'il n'a jamais pu trouver le *B. acidophilus* chez un enfant nourri exclusivement au sein et bien portant.

Contrairement à cette opinion et conformément à celle sou-

1. PASSINI, Ueber das regelmässige Vorkommen der verschiedenen Typen der streng anaerobischen Buttersäurebakterien im normalen Stuhle, *Jahrb. f. Kinderh.* vol. LVII, p. 87.

2. MORO, Ueber die nach gram färbbaren Bacillen des Sänglings Stuhles, *Wien. Klin. Wochenschrift*, 1900, n° 5, et Ueber den *Bacillus acidophilus*, *Jahrb. f. Kind*-1900, vol. LII, p. 38.

3. TISSIER, *Loc. cit.*, p. 97.

tenue par *Moro* et *Cahn*, j'ai pu isoler des acidophiles dans les cinq cas que j'ai étudiés, dont 4 se rapportaient à des nourrissons *absolument bien portants* et nourris *exclusivement au sein*.

J'ajoute que dans deux de ces cas j'ai cherché les acidophiles dans le lait de la nourrice et que j'ai pu les isoler de ces laits.

Enfin, dans un de ces cas, j'ai fait un essai de numération comparative des espèces microbiennes. Je me réserve de publier le résultat de ces numérations quand j'aurai réuni un plus grand nombre d'observations, mais je puis dire dès à présent que, d'après le résultat de cette numération, l'acidophile était non seulement présent dans la selle, mais encore très abondant, quoique en moins grande quantité que le *Bifidus*; il s'agissait pourtant d'un enfant rigoureusement normal et exclusivement nourri au sein maternel.

C'est ici le lieu d'insister sur une particularité biologique de ce microbe, susceptible d'en faire méconnaître la présence :

Si l'on essaie de pratiquer l'isolement de l'A. en ensemençant doublement les selles sur milieu *solide* acide, sucré ou non, on n'obtient pas ou presque pas de colonies d'acidophiles. Ce microbe a besoin de se multiplier d'abord en milieu *liquide* acide, après quoi on peut le transporter sur milieu *solide*.

J'ai utilisé la technique suivante : la dilution de selles en bouillon est acidifiée avec 1 goutte d'acide lactique pour un tube habituel de bouillon (8-10 c. c.), on met à l'étuve et au bout de 24 heures on repique sur un 2^e tube de bouillon acidifié avec 2 gouttes d'acide lactique. Le lendemain, on pratique l'isolement sur une série de tubes ou plaques d'agar acide sucré : l'acidophile pousse alors abondamment, souvent en culture pure ou presque pure.

Si les descriptions de *Moro* et de *Tissier* concernant l'acidophile sont assez analogues quant aux caractères culturels, elles diffèrent sensiblement quant à la forme du bacille.

Tandis que *Moro* le décrit et le représente comme un bacille mince à extrémités légèrement pointues, souvent rangé en éléments parallèles, il se présente, pour *Tissier*, sous forme

1. Il est bien entendu que ces résultats ne concernent que les nourrissons observés à Bucarest; il se peut qu'il en soit autrement à Paris.

d'un gros bacille trapu à extrémités arrondies *facilement reconnaissable dans les selles*.

Je ne puis accepter cette dernière assertion : je crois que, dans la majorité des cas, il est impossible, sur les frottis de selles, de distinguer l'acidophile du *bifidus* ; en particulier, dans le cas cité plus haut, où j'ai pu, par une numération, acquérir la certitude que l'A. était en abondance, l'aspect des frottis de selles était absolument uniforme et il n'était pas possible de faire de distinctions parmi les éléments colorés par le gram.

Il est d'ailleurs fort probable, ainsi que l'a écrit Moro, que les selles normales contiennent non *un* acidophile mais *plusieurs variétés* d'acidophiles assez variables morphologiquement. Nous connaissions déjà les deux variétés décrites par Moro et Tissier.

Cahn¹ décrit 3 variétés de colonies d'acidophiles, Weiss², dans un récent travail, qui, il est vrai, ne paraît pas se rapporter spécialement aux selles du nourrisson, se livre à une étude particulière des acidophiles recueillis sur des cadavres et en divers points du trajet intestinal. Il a ainsi isolé 7 espèces acidophiles dont 4 bacilles et 3 coques.

Son n° 1 est un bacille sensiblement identique à celui de Moro-Finkelstein-Rodella, bien que *gazogène* (le bacille de Moro ne l'est pas).

Le n° 2 est un bacille court et gros, en lancette, surtout aérobic, il donne de l'indol et se rapproche, d'après l'auteur, du *lactis aerogenes* d'Escherich.

Le n° 3 est un bacille court et gros, droit ou légèrement incurvé, il y a des formes courtes et longues, on le voit disposé en petits groupes, en chaînes, ou en filaments ; il est mobile et présente des analogies avec le bac. n° 1 de Ciechomsky et Jakowsky³.

Le n° 4 est un bacille fin, allongé, filamenteux, ressemblant au bacille tuberculeux. Il est aérobic absolu, donne une pellicule à la surface du bouillon, *liquéfie la gélatine*, dissout l'albumine et donne de l'H²S. Il se rapproche du *b. liquefaciens ilei* de Macfayden, Nencki et Sieber⁴.

1. CAHN, Ueber die nach gram färbbaren Bacillen des Säuglingsstuhles, *Centralbl. f. Bakt.* 1901, Bd XXX, N° 49, p. 721.

2. HUGO WEISS, Zur Kenntniss der Darmflora, *Centralbl. f. Bakt.* XXXVI, p. 43.

3. CIECHOMSKI et JAKOWSKI, *Arch. f. Klin. Chir.* Bd LXVIII, 1894.

4. MACFAYDEN, NENCKI et SIEBER, *Arch. f. exp. Path. u. Pharmac.* Bd XXVIII, 1891.

Le n° 5 est un gros diplocoque donnant de l'indol et ne coagulant pas le lait. On peut l'assimiler au gros diplocoque mobile n° 3 de *Ciechomsky* et *Jakowsky*. Il est identique au *diplococcus albus intestinorum*.

Le n° 6 est un très petit coque en courtes chaînettes. C'est un streptocoque *non liquéfiant*.

Enfin, le n° 7 est un staphylocoque moyen surtout aérobie, liquéfiant la gélatine d'une façon intense, analogue au *staphylocoque blanc liquéfiant d'Escherich*.

Toutes ces variétés d'Acidophiles décrites par Weiss prennent le gram — aucune n'est pathogène — aucune ne donne de spores. Enfin quelques-unes de ces variétés sont très acidophiles : aussi les n°s 2, 3, 4, 5, poussent dans un bouillon acide à 5 0/0 d'acide acétique.

Ei ce n'est pas encore tout pour ce qui concerne les acidophiles : *Escherich*¹, *Finkelstein*² attribuent à certaines variétés d'acidophiles son rôle pathogène dans certaines entérites.

*Cahn*³ prétend avoir trouvé l'A. dans les organes et même le cœur d'enfants ayant succombé à des gastro-entérites.

Enfin *Salge*⁴, dans un récent travail, étudiant la flore de certaines gastro-entérites où prédominent les symptômes d'ordre toxique, trouve l'aspect des frottis absolument analogue à celui des selles normales, et dans les cultures il isole un acidophile. Comme on ne peut admettre que, dans une aussi profonde altération des voies digestives, la flore reste inaltérée, il suppose que l'acidophile isolé dans ces cas doit être différent de l'acidophile normal. Mais toutes les tentatives qu'il a faites pour démontrer l'action pathogène de ce microbe sont restées sans résultat et il n'a pu trouver que des différences tout à fait insignifiantes d'avec l'acidophile habituel.

Salge paraît d'ailleurs mal au courant de la question de la flore normale : il ne fait aucune mention du *bifidus* et paraît croire que c'est l'acidophile qui est l'espèce principale des selles normales, or il est précisément fort possible que dans

1. ESCHERICH, Epidemisch auftretende Brechdurchfälle in Säuglings-spitelern, *Jahrb. f. Kinderh.* vol. LII, p. 1.

2. FINKELSTEIN, Ueber Säureliebende Bazillen im Säuglingsstuhl, *Deutsche medic. Wochenschr.* 1906, n° 46.

3. CAHN, *Centralb. f. Bakt.* 1904, *Loc. cit.*

4. SALGE, Ein Beitrag zur Bakteriologie des Enterokatarths, *Jahrb. f. Kind.* 1904, vol. LIX, p. 399.

les gastro-entérites en question il y ait substitution de l'*Acidophile* qui est très acidorésistant, au *Bifidus* qui l'est beaucoup moins, les selles de ces malades étant en général d'une acidité très marquée. — Ce point mériterait une étude particulière.

Pour mon compte, j'ai eu entre les mains 3 échantillons d'acidophiles, assez variables morphologiquement et très analogues au point de vue cultural :

1° Un bacille gros, court, trapu, à bouts carrés, habituellement disposé en assez longues chaînes ;

2° Un bacille mince à extrémités arrondies, non groupé en chaînes, mais disposé en séries de plusieurs éléments parallèles — rarement on voit 2 ou 3 bacilles bout à bout ;

3° Un bacille très court qui est à la variété de Moro ce que le diphtérique court est au diphtérique commun.

Ces trois formes ont persisté non modifiées dans les divers repiquages, mais les caractères culturaux étaient identiques dans les 3 variétés et répondaient très exactement à la description de Moro : je crois inutile d'y insister. Je vais seulement noter quelques particularités que j'ai observées.

a) Contrairement à certaines descriptions (Moro), les échantillons que j'ai isolés ont tous parfaitement poussé en gélatine à 20°, soit en surface, soit en profondeur. — Je me suis servi de gélatine sucrée. — Dans aucun cas la gélatine n'a été liquéfiée.

b) Les acidophiles que j'ai isolés ne poussent pas en agar teinté de vert malachite, que le milieu soit ou non sucré (1 goutte de la solution de vert malachite à 1 0/0, pour un tube contenant de 8 à 10 c. c. de bouillon).

c) D'après Moro, dans les milieux liquides l'A. perd sa colorabilité par le gram en 2 à 6 jours.

J'ai trouvé ce caractère très variable : dans un cas, la perte de la colorabilité par le gram était à peu près nulle ; même dans les cultures vieilles de 15 jours et plus, les éléments bacillaires se coloraient presque tous. Mais dans tous les autres cas on observait une perte plus ou moins rapide de la colorabilité par le gram, plus accentuée en milieux liquides, mais se montrant aussi en milieux solides.

Sans doute il s'agit là, comme le dit Tissier¹, d'un phénomène banal de vitalité moindre de certains éléments, mais ce phénomène paraît ici plus accusé qu'ailleurs : déjà, au bout de 24 heures de culture, on trouve souvent un *grand nombre* d'éléments décolorés, au point que, si on n'est pas prévenu, on peut croire qu'on a affaire à un mélange de deux espèces bacillaires.

d) En bouillon additionné de savon médicinal l'A. pousse bien. Au bout de 48 heures environ, le bouillon, d'abord troublé, se clarifie, et il se fait un abondant dépôt floconneux au fond du tube². *Salge*³ a bien étudié ce qui se passe dans ces cas.

D'après lui, les milieux contenant des substances grasses favorisent le développement des acidophiles (tout au moins de l'A. qu'il a isolé de certaines entérites).

Si l'on utilise du bouillon auquel on ajoute de l'oléate de soude, il se fait une culture abondante, le bouillon se trouble, et au fond du tube se précipite un dépôt floconneux. — Si on centrifuge, on constate que le bouillon ne contient plus ni oléate de soude ni acide oléique, mais un mélange d'acides propionique et butyrique : il y a eu décomposition de l'acide oléique et formation d'acide gras inférieurs.

e) Relativement aux variétés de forme dans les cultures, elles sont considérables suivant les milieux employés, comme l'a bien vu Tissier : formes courtes, longues, filaments, formes en massue. Mais, bien que j'aie expérimenté un grand nombre de milieux, et que j'aie pu obtenir des formes dégénératives très anormales (virgules, massues etc.), je n'ai jamais observé de ramifications *vraies*, même avec la « wasser-cultur » exécutée scrupuleusement d'après la technique de Moro. — Les formes les plus anormales m'ont été fournies dans les milieux savonneux.

II

Bacillus pseudodiphthericus gazogenes. (Espèce nouvelle.) Ce bacille a été isolé des selles d'un nourrisson de 5 mois alimenté exclusivement au sein maternel.

1. Je rappelle qu'il s'agit là d'une réaction commune à beaucoup d'espèces microbiennes, et non d'un caractère particulier à l'acidophile.

2. *SALGE, Loc. cit.*

Une dilution de selles, en bouillon, a été portée rapidement à l'ébullition puis refroidie et mise à l'étuve. — Au bout de 4 jours, j'ai fait, avec cette dilution, des ensemencements sur agar sucré et c'est ainsi que j'ai obtenu, à l'état de pureté, l'espèce que je vais décrire :

C'est un *bacille* ayant les dimensions du diphtérique, droit, à extrémités arrondies et parfois épaissies en forme de massue. — Les éléments bacillaires sont généralement isolés et présentent des dispositions en V analogues à celles du diphtérique. Dans *une seule* de mes cultures, vieilles de 10 jours, en agar sucré, les bacilles étaient disposés en chaînes, affectant l'aspect streptobacillaire. Cet aspect n'a pas persisté dans les repiquages.

Ce bacille *prend le gram* d'une façon intense et uniforme dans les cultures jeunes. — Dans les cultures vieilles de quelques jours, on voit de nombreux éléments décolorés comme dans les cultures d'acidophiles.

Jamais je n'ai pu noter de ramifications vraies. Ce bacille ne donne *pas de spores*.

Sur *agar sucré* incliné ce bacille cultive abondamment. Au bout de 24 heures on voit à la surface de l'agar de très nombreuses colonies plates absolument transparentes, en gouttes de rosée, très régulièrement arrondies, ayant environ 1/2 millimètre de diamètre. — Au bout d'une huitaine de jours, les bords des colonies se dentèlent et de ces bords on voit pousser des prolongements, sous forme d'arborisations élégantes, tandis que le centre de la colonie devient jaunâtre et légèrement acuminé.

En *agar sucré profond*, il se développe, au bout de 42 heures, d'abondantes colonies fines, blanchâtres, floconneuses, irrégulières, respectant au début la zone aérobie. *Il y a une abondante production de gaz* qui fragmente l'agar sur toute sa hauteur.

En *bouillon glycosé* on obtient en 24 heures une riche culture. Il se fait au fond du tube un dépôt blanchâtre abondant. Le bouillon reste clair. La culture dégage une légère odeur de fromage aigri.

En *agar et bouillon non glycosé* le pseudodiphtérique pousse aussi mais la culture est beaucoup plus pauvre.

Sur *agar sucré acide*, il se refuse absolument à pousser, même si l'acidification est très légère.

Sur *gélatine inclinée* à 20°, sur *pomme de terre* à 37°, sur *sérum de Lœffler* à 37° je n'ai pas pu obtenir de culture.

Sur *gélatine sucrée profonde* à 20°, le bacille pousse en 5 à 6 jours, en donnant des colonies sphériques sans prolongements, légèrement brunâtres, atteignant jusqu'à 1/2 millimètre de diamètre.

En *gélatine-piqûre* la culture réussit plus difficilement. Les colonies se développent le long du trait de piqûre.

Sur *lait* la culture est abondante. Le lait tournesolé vire au rouge en 24 h., mais la coagulation ne se fait pas, même à la longue. — Au bout de 25 jours le lait tournesolé revire au bleu.

La *vitalité* de cette espèce m'a paru faible. — Au bout de 10 à 12 jours les cultures ne sont généralement plus vivantes. — Cependant j'ai pu une fois obtenir un résultat positif en repiquant une culture en lait de 28 jours.

L'*action pathogène* de ce microbe paraît nulle : elle a été essayée sur une souris blanche et sur un lapin : malgré de fortes doses injectées, les animaux n'ont nullement souffert.

Cette espèce doit être classée dans le groupe des pseudodiptériques, à côté de l'acidophile dont elle diffère par ses caractères cultureux, par la production de gaz et par l'impossibilité de pousser en milieu acide.

Elle se rapproche beaucoup du *B. exilis* de Tissier dont elle diffère surtout par la production de gaz et la non coagulation du lait.

Elle se rapproche aussi de l'espèce IV de Rodella ¹ dont elle se distingue surtout parce que cette espèce liquéfie la gélatine et qu'elle est anaérobie.

En résumé, il s'agit ici d'une variété de pseudodiptérique, groupe pour lequel l'intestin paraît être un milieu de choix, à en juger par les nombreuses variétés qu'on y rencontre (*acidophiles*, *exilis*, variétés IV, V, VI, de Rodella etc...)

Bacillus nebulosus gazogènes ². (Espèce nouvelle.) Ce bacille a été isolé des selles d'un enfant antérieurement dyspeptique et

1. RODELLA, *Zeitsch. f. Hyg.* 1902.

2. Une culture de ce bacille a été déposée en juin 1904 chez Kral, à Prague.

a imenté exclusivement au babeurre. Il faisait partie de la flore habituelle de ce nourrisson, car il a été retrouvé en assez grande abondance dans 3 examens faits à 1 mois de distance.

Il a été obtenu en chauffant des dilutions de selles à 80° pendant 3, 5 et 8 minutes (procédé de Rodella). En ensemençant en agar profond la dilution chauffée pendant 8 minutes, nous avons obtenu le microbe en question. Il s'agit d'un *bacille, anaérobie facultatif, gazogène*, allongé, d'environ 3 à 5 μ , droit à extrémités arrondies.

Il est *immobile*. Il se *décolore complètement par le gram*.

Dans les diverses cultures, il présente un polymorphisme assez maigre, surtout quand les cultures sont quelque peu vieilles : on observe alors des formes longues, les unes droites, les autres légèrement incurvées, et aussi des filaments. On peut aussi voir quelques ramifications *vraies*, mais cela exceptionnellement.

Pas de spores.

Sur *agar simple incliné*, il cultive en 24 heures en donnant d'assez grandes colonies (de 1. 2 millim. environ de diamètre) en forme de « cachet », c'est-à-dire à centre bombé entouré d'une collerette plate. Ces colonies sont transparentes, à peine légèrement opalines.

Les jours suivants, la colonie s'aplatit, tout en s'agrandissant jusqu'à 1 millim. et plus de diamètre; en même temps, son centre devient finement granuleux. Enfin, elle finit par devenir invisible. Au niveau des colonies on voit souvent quelques bulles de gaz dans l'épaisseur de l'agar.

En *bouillon peptonisé*, le bouillon se trouble au bout de 48 heures, il s'éclaircit de nouveau, et au fond du tube se précipite un léger dépôt pulvérulent. La culture dégage une légère odeur butyrique.

La croissance se fait identiquement, que l'on pratique ou non l'anaérobiose.

Pas d'indol dans la culture, pas même au bout de 15 jours.

L'*acidification* du bouillon est déjà évidente au bout de 24 heures.

Le *lait* est coagulé vers le 5^e jour. Pas de peptonisation.

Sur *pomme de terre* on n'observe pas de culture.

La culture sur *agar profond sucré* est absolument *caractéristique* :

les colonies ont l'aspect de flocons, de boules d'ouate, blanchâtres, arrondies, ayant 2 à 4 millimètres de diamètre. Le centre du flocon est constitué par un noyau plus opaque que la périphérie qui est demi-transparente. A la loupe, on distingue, dans la zone transparente, de fines et élégantes arborisations à disposition rayonnante.

Le développement de cette culture est accompagné d'un abondant dégagement de gaz qui fragmente l'agar.

Au début, la surface du tube (zone de l'aérobiose) est respectée; ce n'est que dans la suite que les colonies l'envahissent aussi.

Si l'agar est quelque peu caramélisé, on ne voit plus d'arborisations et toute la colonie représente un nuage, une sorte de halo demi-transparent avec un centre à peine un peu plus dense.

En *agar profondensemencé par piqûre*, ce bacille pousse abondamment sur le trajet du trait d'ensemencement; on voit tout le long un chapelet de bulles de gaz.

Sur gélatine profonde à 20°, il pousse bien en 3 à 4 jours, en donnant des colonies régulièrement arrondies et un peu brunâtres. *Pas de liquéfaction*.

Sur gélatine inclinée sucrée (aérobiose), on voit une assez abondante culture constituée par de fines colonies complètement transparentes, à contour assez irrégulier, bien que généralement arrondies.

Sur sérum de Löffler pas de culture apparente.

L'action pathogène de cette espèce paraît nulle. J'ai injecté 10 c.c. de culture en bouillon de 24 heures dans le péritoine d'un lapin, sans aucun résultat.

J'ai injecté 1/10 de c.c. du dépôt d'une culture du bouillon dans le péritoine d'une souris, sans que l'animal éprouve aucun trouble.

Je n'ai trouvé cette espèce décrite nulle part. *Le bacille n° 1 de Rodella*¹ donne bien une culture analogue en tubes profonds, mais il s'agit d'une espèce, colorable par le gram, donnant des spores, peptonisant le lait.

*Le bacille n° 1 de Weiss*² se rapprocherait plus ou moins du

1. RODELLA, *Zeitschr. f. Hyg.* 7 févr. 1902.

2. WEISS, *Centralblatt*, XXVI, p. 46.

nôte, mais il se colore bien par le gram, pousse sur pomme de de terre et ne pousse pas sur gélatine.

*Coccobacillus minutissimus gazogenes*¹. (Espèce nouvelle.) Cette espèce paraît être assez fréquente. Je l'ai rencontrée 2 fois dans les selles d'enfants nourris exclusivement au sein, et 1 fois chez le nourrisson alimenté au babeurre. Ce microbe est habituellement en symbiose avec des espèces banales dont il est souvent fort difficile de l'isoler.

C'est un très fin coccobacille, à peine un peu plus long que large, mesurant environ 0 μ .3 à 0 μ .5, groupé comme un staphylocoque en grappes; ces grappes sont *cohérentes et difficiles à dissocier*. Il ne varie pas de forme. Il est *immobile*.

Il se colore en général mal par les colorants habituels et se *décolore complètement par la méthode de Gram*. C'est *surtout un anaérobie*. Il tient le milieu entre les anaérobies facultatifs et les anaérobies stricts, en ce sens qu'il ne pousse pas sur les milieux aérobies, mais pousse même quand l'anaérobiose est relative.

Il est *gazogène*.

L'agar sucré profond est le milieu de choix.

On commence à voir les colonies au bout d'environ 36 heures. Ces colonies grandissent en 3 à 4 jours, acquièrent des diamètres de 1/4 et 1/2 millimètre. Elles sont blanches, opaques et de forme très irrégulière (angulaires, à facettes, bosselées, etc...). L'agar est fragmenté par de nombreuses bulles de gaz non fétide. A la surface de la colonne il y a constamment une zone d'environ 1 centim. respectée par la culture (zone de l'aérobiose).

En *agar incliné glycosé avec anaérobiose*, il pousse très mal, très pauvrement et pas toujours. Cependant, les rares colonies, qui poussent atteignent d'assez fortes dimensions (1 millim. diamètre). Elles sont régulièrement arrondies, opalinées et surélevées. On voit de grosses bulles de gaz dans la profondeur de l'agar, en regard des colonies qui ont poussé. Le liquide de condensation contient au fond quelques flocons mais reste clair.

En *agar incliné glycosé sans anaérobiose*, il ne se fait pas de culture, excepté dans le liquide de condensation (dépôt floconneux). Au niveau de ce liquide floconneux on voit, dans l'épaisseur de l'agar, une bulle de gaz, mais le reste du tube reste stérile.

1. Un échantillon de ce coccobacille a été déposé en juin 1904 chez Kral.

En *agar sucré profond acide* pas de développement.

En *bouillon sucré* on obtient une culture pauvre si on ne pratique pas l'anaérobiose, beaucoup plus abondante si on la pratique.

Au bout de 24 h., il se dépose au fond du tube un amas de fins grumeaux; chacun d'eux étant constitué par un amas cohérent de coccobacilles fort pénible à dissocier. Le bouillon reste clair à la surface.

La culture *ne dégage pas d'odeur*.

Il n'y a *pas de production d'indol*.

L'acidification du milieu est très faible; à peine peut-on la constater vers le 4^e jour.

Le *lait* n'est pas coagulé, même au bout de 40 jours.

En *milieux anaérobies non sucrés* (agar profond, bouillon), le développement se fait aussi, mais moins bien qu'en milieux sucrés. Il y a aussi abondante production de gaz.

En *agar profond en piqûre*, le développement se fait bien sur le trajet du trait d'ensemencement; tout le long on voit un chapelet de bulles gazeuses.

En *gélatine, sucrée ou non, en tube profond*, il ne se fait *aucune culture*.

La *culture en bouillon* sans anaérobiose est très abondante, si en culture le coccobacille en symbiose avec un staphylocoque; mais sur *milieux solides*, malgré la symbiose, il n'y a pas de culture.

L'action pathogène de ce coccobacille paraît nulle. Ni 7 c.c. de culture en bouillon sucré injectés dans le péritoine d'un lapin, ni 1/10 de c.c. de la même culture dans le péritoine d'une souris n'ont provoqué de symptômes morbides.

Ce *coccobacille* ressemble à l'une des espèces (n° 6) figurées par Weiss (*loc. cit.* p. 17); mais ce dernier coccobacille est acidophile et prend bien le gram (n° 9), il ne donne pas de gaz, et pousse aussi en milieux aérobies.

Notre *coccobacille* me paraît aussi différent du *coccobacillus anaerobius perfectens* de Tissier (*loc. cit.* p. 70). Cette espèce a des dimensions plus grandes (0,8 à 1 μ), elle se colore facilement par les colorants basiques, ne présente pas cette disposition constante et caractéristique en grumeaux incohérents, et surtout dégage des gaz extrêmement fétides.

Le *staphilococcus parvulus* de Veillon et Zuber pousse à 22, 23° et donne en gélatine des colonies caractéristiques opaques, brunâtres et granuleuses, il donne également des gaz fétides et est pathogène pour le cobaye et le lapin.

*Bacillus intestinalis tuberculiformis*¹. (Espèce nouvelle.) Ce bacille a été isolé dans tous les cas que j'ai étudiés (4 enfants au sein exclusivement, et 1 au babeurre). J'examinerai plus loin son mode d'isolement et la très intéressante question de ses analogies avec le *bifidus*.

C'est un très fin bacille, *immobile*, ayant les dimensions et l'aspect général du bacille tuberculeux; il *se colore par le gram, mais d'une façon inégale* (espaces clairs) comme le bacille diphtérique et sa colorabilité persiste même dans les cultures plus anciennes (15 jours), bien que l'on rencontre, dans ce dernier cas, un assez grand nombre d'éléments décolorés.

Il ne se colore pas par la méthode de Ziehl.

Il présente un *polymorphisme* assez accusé: dans la même culture on voit, à côté d'éléments typiques, d'autres courts comme des coccobacilles et aussi des formes très allongées. Les bacilles se disposent souvent par deux, bout à bout, et même parfois on en voit 3 à la file. En ce cas, les éléments présentent souvent des directions différentes de sorte que les formes en V sont très fréquentes. Les extrémités des bacilles sont généralement pointues.

Parfois, l'aspect est encore plus anormal: on trouve alors des formes incurvées en virgule, ou en V, ou des diplobacilles en S.

Les formes en massue, en point d'exclamation, ne sont pas rares, et on trouve souvent des *ramifications vraies*. Mais ces ramifications ont un aspect tout différent de celle du *bifidus*; il n'y a jamais plus d'une branche, et elle paraît généralement latérale; les ramifications sont fines et allongées, et souvent très inégales, tandis que chez le *bifide* elles sont courtes, trapues, habituellement égales et presque toujours renflées à leur extrémité.

Ce bacille ne donne *pas de spores*.

Il est *presque exclusivement anaérobie*.

Son milieu de choix est l'*agar profond sucré*. La culture

1. Une culture de ce bacille a été déposée en juin 1904 chez Kral.

début au bout d'environ 36 heures, mais n'est bien développée que vers la 48^e heure.

Les colonies sont blanc opaque, fixes, tout d'abord irrégulières au moment où elles commencent à poindre, puis lenticulaires. Elles atteignent, au bout de quelques jours, jusqu'à 4 millim. et plus de diamètre et, quand elles sont âgées, on voit souvent pousser, sur une face de la lentille ou même sur chacune des faces, un prolongement en forme de demi-lentille dont le plan est perpendiculaire à celui de la lentille primitive ; on a alors l'aspect d'une graine d'ombellifère.

La zone aérobie de la surface du tube est toujours respectée. Il n'y a pas de dégagement de gaz.

En *bouillon glycosé* avec anaérobiose, ce bacille pousse bien, en 48 heures environ ; le bouillon se trouble d'abord puis se clarifie et au fond du tube on voit un assez abondant dépôt finement grumeleux qui adhère aux parois du tube. Dans les vieilles cultures, ce dépôt prend une teinte *rose* très accusée.

La culture en bouillon dégage une légère odeur aigrelette.

L'*acidification* du milieu est rapide et intense ; elle donne, au bout de quelques jours, avec la teinture de tournesol, une coloration rouge vin de Bordeaux.

Si l'on ne pratique pas l'anaérobiose, la culture en bouillon se fait tout de même, mais elle est beaucoup plus pauvre.

Sur lait il n'y a pas de développement apparent.

Sur pomme de terre non plus.

Sur bouillon glycosé additionné de lait, la culture se fait comme en bouillon, le lait finit par être précipité, au bout d'une vingtaine de jours, sous forme de flocons.

Sur agar profond en piqûre le développement se fait bien tout le long du trait, excepté dans la zone de l'aérobiose qui finit cependant aussi par être envahie à la longue.

Sur gélatine glycosée ensemencée à l'état liquide ou en piqûre, à 20°, il n'y a pas de croissance.

Sur agar incliné glycosé, sans anaérobiose, la culture est inconstante mais caractéristique. On ne peut l'obtenir toujours ; il faut faire un ensemencement abondant, massif, de préférence, en écorchant superficiellement l'agar.

Au bout de 36 heures environ, on voit le liquide de conden-

sation se troubler, puis il se forme au fond quelques grumeaux, tandis que la surface de l'agar paraît rester stérile.

Ce n'est qu'au bout d'environ 10 *jours* que l'on voit se développer, à la surface de l'agar, de rares et fines colonies d'un blanc opaque, très bombées, en 1/2 sphère, et d'aspect crémeux.

Ces colonies se développent exclusivement aux environs de la surface du liquide de condensation, ou encore autour des colonies anciennes exposées à la surface de l'agar par l'ensemencement, comme autant de satellites.

Les jours suivants elles grandissent en se surélevant de plus en plus et finissent par atteindre 1 millim. et plus de diamètre. Elles sont d'un blanc éclatant, crémeuses, gluantes et entourées au début d'une mince collerette muqueuse demi-transparente qui disparaît dans la suite. En vieillissant, elles prennent généralement une teinte rose très accusée. Dans cette culture aérobie prédominent les formes courtes. En repiquant ces colonies sur agar profond, on obtient la culture caractéristique décrite plus haut.

Comme on le voit, il s'agit ici d'une espèce très particulière.

La description précédente est basée sur l'étude de 5 échantillons de source différente qui se sont montrés tous semblables. La *vitalité* de ce bacille est assez grande. J'ai pu le repiquer après 15 jours et même 3 semaines.

Le bacillus tuberculiformis ne paraît pas être pathogène : une culture entière de ce bacille a été injectée dans le péritoine d'un lapin : le lapin n'a présenté aucun signe de maladie.

1/10 de c. c. de dépôt d'une culture en bouillon a été injecté dans le péritoine d'une souris sans aucun résultat. Cette dernière expérience a été répétée avec chacun des 5 échantillons que j'ai eu entre les mains, toujours avec le même résultat négatif.

Le b. tuberculiformis intestinalis est intéressant à plus d'un point de vue. Tout d'abord nous l'avons rencontré 5 fois sur 5 examens de selles : C'est donc une forme très fréquente, sinon constante. Mais s'agit-il bien là d'une *espèce* nouvelle? L'analogie d'aspect des colonies en agar profond de cette espèce et du *bifidus* est telle, qu'il est absolument impossible de les distinguer, et ce n'est que grâce à un hasard que j'ai pu isoler ce bacille : Je conservais une culture de *bifidus* de mon cas I, que

je repiquais tous les 8 jours. J'étais persuadé de la pureté absolue de cette culture, attendu que les repiquages étaient faits chaque fois avec une colonie unique préalablement vérifiée. Au bout de 3 mois de repiquages successifs, je songe à réensemencer mon bifide et quand je veux le repiquer il ne pousse plus : alors je fais un nouvel essai de repiquage en prenant à la fois une grande quantité de colonies pour avoir plus de chances de trouver encore quelques microbes vivants. Or, dans le tube d'agar ainsi ensemencé, il ne pousse que deux colonies et ces colonies étaient constituées par le *tuberculiformis*. J'ai conservé cette espèce. Quelque temps après, il m'arriva exactement la même chose avec le *bifidus* de mon cas II.

Dans mon cas III, le *T.* a été isolé d'une dilution de selles que j'avais conservée pendant un mois, puis chauffée à 80° pendant 5 minutes.

On peut donner à ces faits deux interprétations :

a) Ou bien les cultures que je possédais n'étaient pas des cultures pures de *bifidus*, et dans ce cas on doit admettre qu'il existait une symbiose très intime, des colonies mixtes, puisque mes cultures avaient été obtenues toujours par repiquage d'une colonie unique. Le *tuberculiformis* ayant une viabilité plus longue que le *bifidus* a seul persisté quand j'ai tardé à faire le repiquage ;

b) Ou bien le *tuberculiformis* n'est qu'une transformation du *bifidus*.

Cette deuxième interprétation me paraît cependant très difficile à admettre, attendu que les deux bacilles présentent des différences très marquées :

1° Leur forme, les caractères de leurs ramifications sont très différentes (voir plus haut) ;

2° L'un est anaérobie absolu, strict, l'autre anaérobie relatif ;

3° La très caractéristique culture en agar aérobie qui est spéciale au *tuberculiformis* ;

4° La vitalité plus longue du *tuberculiformis*.

J'ai fait de nombreux essais pour transformer le *tuberculiformis* en *bifidus*, mais j'ai toujours échoué.

Une autre raison m'empêche de considérer le *tuberculiformis* comme une forme de vieillissement du *bifidus* : c'est que dans mes cas IV et V j'ai pu isoler le premier directement des selles. J'ajoute que, chez une femme adulte, je l'ai retrouvé avec ses

caractères typiques dans la matière caséuse d'une amygdalite lacunaire.

Je pense cependant que ce point mérite de nouvelles recherches et cela d'autant plus que *Passini* (*loc. cit.*) soutient que le *bifidus* est un anaérobie relatif. — A-t-il eu entre les mains des cultures mixtes de *bifidus* et de *tuberculiiformis*, ou bien est-ce que le *bifidus* peut dans certaines conditions se transformer et s'adapter à des milieux non rigoureusement privés d'air?



1. *Coccobacillus minutissimus gazogenes*. — 2. Bacille acidophile (variété courte). — 3. Pseudo-entérocoque anaérobie. — 4. *B. pseudo-diphthericus gazogenes*. — 5. *B. nedubulosus gazogenes*. — 6. *B. nebulosus gazogenes* (variété longue). — 7. *B. intestinalis tuberculiiformis*. — 8. Quelques formes anormales de *B. intestinalis tuberculiiformis*.

Avant de terminer, je veux signaler une espèce que j'ai eu entre les mains, mais que je n'ai pu étudier complètement, les cultures étant mortes au bout de quelques jours.

	MOBILITÉ	Colorabilité.	MODE de vie.	Température	FORME	CULTURE en agar incliné.	CULTURE en agar profond. Développement gaz.
<i>Pseudo-diphthericus gazogenes</i>	O	Col. par le gram : nombreux éléments décolorés dans les vieilles cultures.	Aérobic et anaérobic.	37° 20°	Bacille présentant les dimensions, la forme et les dispositions du b. diphtérique.	En 24 heures, fines colonies plates et transparentes, en gouttes de rosée.	En 24 heures, colonies blanches, floconneuses, irrégulières. La zone de l'abiose est respectée au début. Abondante production de gaz.
<i>Bacillus nebulosus gazogenes</i>	O	Décoloré par le gram.	Facultatif. Plus anaérobic qu'aérobic.	37° 20°	Bacille de 3 à 5 μ , à extrémités arrondies. Polymorphisme marqué : formes allongées et filamenteuses, quelques ramifications vraies.	En 24 heures, grandes colonies plates, transparentes, d'environ 1/2 millimètre de diamètre.	Colonies caractéristiques en boîtes d'ouate de 4 mil. de diamètre à centre plus que. Zone de l'abiose au début respectée. Abondante production de gaz.
<i>Bacillus minutissimus gazogenes</i>	O	Décoloré par le gram. Prend malles colorants habituels.	Surtout anaérobic. Pousse aussi, mais mal en anaérobiose relative.	37°	Très fin coccobacille de 0 μ ,3 à 0 μ ,5, en grappes. Les éléments sont groupés en grumeaux difficiles à dissocier.	Ne pousse que si on pratique une anaérobiose relative et encore très pauvrement. Colonies arrondies, opalescentes et surélevées. Bulles de gaz dans la profondeur de l'agar.	En 36 heures, colonies blanches opaques, irrégulières. Zone de l'abiose respectée. L'agar est menté par de nombreuses bulles de gaz.
<i>Bacillus intestinalis tuberculiformis.</i>	O	Coloré, mais inégalement par le gram. Non coloré par la méth. de Ziehl.	Anaérobic. Pousse à peine en aérobiose.	37°	Très fin bacille ayant les dimensions et l'aspect général du bacille tuberculeux. Polymorphisme : éléments courts, filaments. Éléments incurvés en V et S. Formes atypiques en massue et ramifications vraies.	Culture inconsistante. Le liquide de condensation cul-tive en 36 h. A la surface de l'agar, la culture ne se voit que vers le 10 ^e jour. Colonies blanches, arrondies, demi-sphériques, d'aspect crémeux, devenant roses quand elles vieillissent.	Culture de 36-48 heures. Colonies blanches opaques, lenticulaires ou en nœuds d'ombellules absolument invisibles à cellule. <i>Bifidus</i> .
<i>Pseudo-enterococcus</i> (étudié incomplètement).	=	Coloré par le gram d'une façon intense.	Anaérobic. Aérobiose ?	37° 20°	Coccus en flammes de bougie, le plus souvent groupés en diplocoques. Pas de capsule.	N'a pas poussé.	En 24 heures, colonies blanches, lenticulaires, sans halo. Zone de l'aérobiose respectée.

CULTURE	CULTURE en gélatine sucrée.	CULTURE sur lait.	Culture : pomme de terre.	FREQUENCE	ACTION pathogène.	Sporulation.	PARTICULARITÉS
Bouillon sucré.							
En 24 heures, riche culture. Dépôt abondant au fond du tube. Le bouillon reste clair. Légère odeur de froage aigri. Acidification très légère.	Ne pousse qu'en gélatine profonde. Colonies sphériques. <i>Pas de liquéfaction.</i>	Culture abondante. <i>Pas de coagulation.</i>	O	1 fois sur 5 examens.	Nulle.	O	Ne pousse absolument pas en milieux acides. A été isolé des selles d'un enfant au sein maternel.
Bouillon trouble en 24 heures. En 48 heures dépôt au fond. Légère odeur butyrique. Pas d'indol. Acidification assez rapide.	En <i>gélatine</i> profonde, donne des colonies sphériques en 3-4 jours. En <i>gélatine inclinée</i> , de fines colonies absolument transparentes. <i>Pas de liquéfact.</i>	<i>Coagulé</i> vers le 5 ^e jour. Pas de peptonisation.	O	1 fois sur 5 examens.	Nulle.	O	A été isolé à 3 reprises des selles du même enfant, alimenté au biberon.
Pousse assez bien, si on pratique l'anaérobiose. Dépôt au fond du tube, bouillon clair dessus. Ni odeur, ni indol. Acidification à peine marquée.	O	<i>Non coagulé.</i>	O	3 fois sur 5 examens.	Nulle	O	A été isolé chez 2 enfants au sein et chez un enfant au biberon.
Pousse surtout si on pratique l'anaérobiose. Bouillon, d'abord trouble, se clarifie : au fond, dépôt granuleux, qui dans les vieilles cultures devient rose. Odeur aigrelette. Pas d'indol. Acidification intense	O	O	O	5 fois sur 5 examens.	Nulle.	O	A été isolé chez 5 enfants dont 4 au sein et 1 au biberon. Il présente de nombreuses analogies avec le <i>Bifidus</i> . Le milieu de culture liquide de choix est le bouillon glycosé auquel on ajoute du lait de femme. Le lait est à la longue précipité en flocons au fond du tube.
	Au bout de 8 jours, colonies sphériques. <i>Pas de liquéfaction.</i>	O	O	1 fois sur 5 examens.	?	11	Cette espèce a été perdue dans le cours des recherches. Bien que les tubes aérobie soient restés stériles, il est néanmoins probable qu'il est anaérobie facultatif, puisqu'il pousse sur agar profond en 24 heures, ce qu'aucun anaérobie strict ne fait.

Il s'agit d'un *Pseudo-entérocoque*, isolé des selles d'un enfant alimenté au babeurre, après chauffage d'une dilution de selles à 80° pendant 8 minutes. Il se présente sous la forme d'un diplocoque *non capsulé*, à grains allongés en flamme de bougie : l'allongement des grains est même plus accentué que dans l'entérocoque. On trouve aussi quelques *cocci* isolés.

Ce diplocoque se colore par le gram d'une façon *intense*. Les tubes aérobies ensemencés sont restés stériles.

En *agar profond sucré*, les colonies se voient déjà au bout de 24 heures. En 48 heures, elles sont complètement développées, opaques, lenticulaires, *sans halo* d'environ 1/2 millimètre de diamètre.

La zone de l'aérobiose est respectée.

En *gélatine profonde sucrée*, il pousse lentement, donnant au bout de 8 jours des colonies sphériques pouvant atteindre jusqu'à 1/2 millimètre. La gélatine n'est pas liquéfiée.

A mon grand regret, je n'ai pu pousser plus loin l'étude de cette forme. Sa vitalité étant très restreinte, mes repiquages sont restés stériles.

En terminant l'exposé de ces notes, je dois encore une fois faire remarquer que la présence, dans l'intestin du nourrisson normal, des espèces décrites par moi, ne contredit en rien la façon de voir de Tissier : le *bifidus* reste l'espèce de beaucoup prédominante dans les selles du nourrisson normal au sein : à l'examen des frottis de selles, on ne voit pas autre chose. Les espèces que j'ai isolées en *cultures* sont inconstantes et, quand elles existent, très peu abondantes.

Seul le *B. intestinalis tuberculiformis* est peut-être plus important, car dans un cas où j'ai fait un essai de numération (enfant au sein rigoureusement normal), je l'ai rencontré dans les fortes dilutions ; d'autre part, j'ai pu l'isoler dans mes cinq observations.

Je résume sous forme de tableau les caractères principaux des espèces nouvelles décrites dans ce travail.

Actions des substances hémolytiques sur les Protozoaires, les Spirochètes et les Vibrions.

PAR C. LEVADITI ET A. ROSEMBAUM

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Dans un travail récent, Neufeld et Prowazek¹ ont soutenu l'existence d'une relation étroite entre les protozoaires et les spirochètes, se basant sur la sensibilité de ces microorganismes vis-à-vis de certains glucosides (en particulier la saponine) et du taurocholate de soude. Ils ont constaté que, tandis que les bactéries, exception faite du pneumocoque, vivent et pullulent dans des solutions concentrées de ces substances, par contre, les spirochètes, pareils en cela aux trypanosomes, succombent rapidement sous l'influence de solutions même très étendues. L'emploi de ces agents hémolysants permet donc de démontrer qu'au point de vue de la sensibilité du protoplasma à l'égard de ces principes toxiques, il y a plus d'analogie entre les spirochètes et les protozoaires flagelles, qu'entre ces spirochètes et les bactéries.

L'importance du problème que les savants allemands se sont proposé de résoudre est hors de conteste. On a toujours discuté si les spirochètes sont des protozoaires ou des bactéries, et malgré les nombreuses recherches morphologiques faites dans cette voie, on est loin d'être d'accord sur ce sujet. Nous en avons la preuve dans la découverte des cils du *Sp. gallinarum* (Borrel) qui devait mettre hors de doute la nature microbienne des spirochètes et qui cependant est loin d'avoir entraîné la conviction. Malgré la netteté de ces cils, semblables à ceux des bactéries, certains protozoologistes allemands, entre autres Prowazek, Hartmann et Keisselitz², ne les interprètent pas dans le même sens que Borrel et Zettnow et ne considèrent guère leur existence comme une preuve irréfutable en faveur de la nature bactériacée des spirochètes.

1. NEUFELD et PROWAZEK, *Arb. aus. dem. kais. Gesundheitsamte*, 1907, vol. XXV, fasc. 2.

2. KEISSELITZ, *Arch. für Protistenkunde*, 1907, vol. X, p. 477.

Peu après la publication du travail de Prowazek et Neufeld, nous avons entrepris une série d'expériences afin de préciser *les relations entre les spirochètes, les protozoaires et les bactéries, en recherchant comment ces microorganismes se comportent vis-à-vis de tout un groupe de substances douées de propriétés hémolysantes.* Les faits que nous avons observés font le sujet de ce mémoire dont les principales conclusions ont été déjà résumées antérieurement¹.

I

ACTION DES GLUCOSIDES

Le mécanisme suivant lequel les glucosides agissent sur les hématies pour engendrer l'hémolyse, a été précisé par les recherches de Ransom² concernant la saponine. Cet auteur a montré que si la saponine engendre la dissolution des globules rouges, c'est qu'elle se fixe sur le stroma globulaire grâce à son affinité pour la cholestérine, qui entre dans la constitution de ce stroma. Le pouvoir antihémolytique du sérum normal est également dû à sa teneur en cholestérine, car l'extrait éthéré de ce sérum entrave l'hémolyse, cependant qu'une suspension de cette cholestérine jouit des mêmes propriétés. Ces recherches ont ainsi prouvé, ce qui, d'ailleurs, avait été déjà soutenu par Owerton³, que les glucosides engendrent l'hémolyse en s'attaquant aux lipoides qui constituent la membrane des hématies et ont apporté une preuve indirecte en faveur de l'existence de ces lipoides dans l'enveloppe cellulaire.

Etant donné l'état imparfait de nos connaissances sur la constitution de l'enveloppe membraneuse des protozoaires, il était intéressant de rechercher si les glucosides agissent sur ces derniers de la même manière que sur les hématies et si les lipoides jouent quelque rôle dans l'action zootoxique⁴ de ces

1. LEVADITI et ROSENBAUM, *Bull. de la Société de Pathologie exotique*, 1908, vol. I, n° 2.

2. RANSOM, *Deutsche med. Woch.*, 1904, n° 13, p. 1904.

3. OWERTON, cité d'après HÖBER, *Physic. chem. der Zelle und, der Gewebe*, Leipzig, Engelmann, 1906.

4. Nous appelons « action zootoxique » l'influence toxique exercée par certains agents hémolysants sur les protozoaires (paramécies ou trypanosomes).

glucosides. En poursuivant des recherches dans cette voie, et en choisissant les *paramécies* (*Par. aurelia*) comme sujet d'expérience¹, nous avons constaté ce qui suit :

La saponine, en solution dans de l'eau physiologique, immobilise et tue les paramécies à la dose de 1/10,000, cela presque instantanément. Or, il suffit d'ajouter à plusieurs doses toxiques de saponine (1 c. c. sol. 1 : 10,000) 0,75 c. c. de sérum normal de lapin, porté préalablement pendant 1/4 d'heure à la temp. de 60°, pour empêcher complètement l'immobilisation des paramécies. *Le sérum normal, à la condition qu'il ait perdu par le chauffage sa toxicité propre, neutralise le pouvoir zootoxique de la saponine, de même qu'il entrave la fonction hémolytique de ce glucoside.* Or, on peut démontrer que les lipoides interviennent dans le mécanisme de l'action zootoxique de la saponine, en procédant de deux façons :

a) *En recherchant le pouvoir empêchant de l'extrait éthéré de sérum neuf.* Tout comme dans l'expérience de Ransom, nous avons, en effet, remarqué que le sérum de lapin, épuisé par l'éther, permet d'obtenir un extrait qui, mélangé à plusieurs doses toxiques de saponine, empêche l'immobilisation des paramécies.

b) *En examinant les propriétés de l'extrait éthéré de paramécies.* Si l'on traite par de l'éther une certaine quantité de paramécies isolés par centrifugation, on obtient un extrait qui, mis en contact avec 0,5 d'une solution de saponine à 1 : 10,000, neutralise le pouvoir zootoxique de ce glucoside (act. sur les paramécies).

Ces données montrent que la saponine agit suivant le même mécanisme sur les hématies et sur les protozoaires. Tout comme les globules rouges, ces derniers ont une enveloppe ectoplasmique contenant des lipoides, lesquels sont capables de fixer le glucoside et permettent ainsi au poison d'exercer ses propriétés toxiques. L'analogie entre les protozoaires et les cellules animales, au point de vue de la constitution de leur membrane et de leur sensibilité vis-à-vis des glucosides, est donc des plus frappantes. Or, comme les recherches de Prowazek et Neufeld

1. Nous remercions M. Mesnil pour l'obligeance avec laquelle il a mis à notre disposition les cultures de paramécies.

ont démontré que certains spirochètes se comportent vis-à-vis des glucosides de la même façon que les hématies. il y a tout lieu de croire que ces spirilles offrent les mêmes caractères que les protozoaires, c'est-à-dire qu'ils renferment des lipoïdes dans leur ectoplasma. Nous aurons l'occasion de revenir plus loin sur cette façon de voir conforme à celle énoncée par Neufeld et Prowazek.

II

ACTION DU VENIN DE COBRA ET DE LA COBRA-LÉCITHIDE

Nous avons recherché quelle est l'action exercée par le venin du cobra ¹ sur les protozoaires (paramécies et trypanosomes), les spirochètes et les bactéries et nous avons comparé cette action à celle du même venin sur les hématies. Déjà en 1905, Noc ² et Goebel ³ ont constaté que le venin de cobra exerce une influence toxique manifeste sur les trypanosomes. Suivant Noc, ces flagellés se dissolvent complètement dans une solution de venin à 1 0/0. D'après Goebel, les trypanosomes du Nagana, puisés dans le sang des cobayes infecté et isolés des globules rouges, sont dissouts par une solution de venin à 1/1000 (0,4 c. c. pour 0, 1 de sang tryp.). La destruction des parasites s'opère rapidement à 37° et n'a nullement lieu si on a soin de placer les tubes à 0°. Ces données ont ainsi montré que les protozoaires se comportent à l'égard du venin de cobra tout comme les globules rouges et ont confirmé l'existence d'une étroite relation entre ces protozoaires et les cellules animales, relation que laissaient entrevoir. d'ailleurs, les recherches de Goebel ⁴ concernant l'action des solutions salines sur les trypanosomes.

Nous avons confirmé ces recherches, en ce sens que nous avons vérifié l'action toxique exercée par le venin de cobra sur les trypanosomes du Surra. Mis en présence de 0,25 d'une solution à 1/10,000 de ce venin, ces trypanosomes (sang de souris infectée) s'immobilisent au bout de 10 à 20 minutes, deviennent transparents, laissent voir leurs noyaux et finissent par

1. Le venin de cobra nous a été procuré par M. le Prof. Calmette, que nous prions de recevoir tous nos remerciements.

2. Noc, cité par CALMETTE, *Les venins et les animaux venimeux*, Paris, Masson, p. 217.

3. GOEBEL, *Ann. Soc. méd. de Gand.*, 1905, fasc. 3.

4. GOEBEL, *Ann. Soc. méd. de Gand*, 1906, vol. LXXXVI, p. 11.

se détruire plus ou moins complètement. Cette destruction des trypanosomes ne marche pas de pair avec l'hémolyse des hématies de souris; ces hématies semblent, en effet, être moins sensibles à l'action du venin que les flagellés.

Les trypanosomes ne sont pas les seuls à être sensibles à l'action toxique du venin. En effet, si on met en contact 1 c. c. d'une culture riche en *paramécies*, avec une solution de venin à 1/10,000 (0,5 c. c.; concentration totale du venin = 1/40,000.), on constate que ces organismes s'immobilisent pour ainsi dire immédiatement, se déforment, laissent exsuder des bulles granuleuses et finissent par se transformer en un détritux qui tombe au fond du tube.

Comment se comportent les spirochètes à l'égard du venin de cobra?

Nous avons expérimenté avec les spirochètes de la *Tick-fever* (sang de rat) et le *Sp. gallinarum*, et nous avons trouvé que ses parasites sont assez sensibles à l'action toxique de ce venin. Le sp. de la poule est plus facilement immobilisé par le venin de cobra que le sp. de la fièvre récurrente: dans nos expériences, le *Sp. gallinarum* a été tué par une solution de venin à 1 : 10.000, cependant que le *Sp. Duttoni* ne s'est immobilisé que lentement en présence d'une solution à 1 : 1,000. Nous avons trouvé également que l'hémolyse produite par le venin, mis en présence de sang contenant des spirilles, ne joue aucun rôle dans la destruction des parasites en spirale; en effet, des spirilles de la poule, isolés par centrifugation et débarrassés aussi bien que possible d'hématies, continuent à être sensibles à l'action toxique du venin de cobra.

Ces recherches montrent donc *que non seulement les hématies et les trypanosomes, mais aussi les paramécies et les Sp. Duttoni et gallinarum sont tués par le venin de cobra*. Comment se comportent, à ce point de vue, les bactéries?

Les propriétés bactéricides du venin de cobra ont été étudiées par Calmette¹ et par son élève Noc² qui ont constaté une action bactéricide manifeste avec la bact. charbonneuse, le vibrion cholérique, le staphylocoque doré, etc., et une action bactériolytique moins nette avec le colibacille et le bac. d'Eberth. Nous avons

1. Déjà cité.

2. Noc, Ces *Annales*, avril 1905.

nous-même repris ces recherches en expérimentant avec le *Vibrio Cassino* et nous avons constaté qu'en effet ce vibrion se laisse facilement détruire par 0,5 et 1,0 d'une solution à 1 0/0 de venin. La méthode des plaques nous a montré, d'ailleurs, que cette action bactéricide de venin est presque immédiate; en effet, tandis que dans le tube témoin (renfermant du bouillon) nous avons eu à compter, lors du premier ensemencement, 960 colonies, par contre dans celui qui contenait 0,5 de venin, la stérilisation a été complète et définitive.

Le fait que le venin de cobra agit à la fois sur le groupe hématies-protazoaires-spirochètes et sur les vibrions cholériques semble, au premier abord, venir à l'encontre de l'opinion qui, se basant sur la sensibilité vis-à-vis des poisons hémolytants, établit une séparation entre ces vibrions et les spirochètes, en rapprochant ces derniers des protazoaires. Cependant, l'analyse détaillée des diverses propriétés toxiques du venin montre qu'il n'en est rien et que *la substance bactériolytique de ce venin doit être nettement séparée du principe hémolysant et zootoxique.*

A ce propos, nous avons établi, tout d'abord, que les propriétés *hémolytiques*, *zootoxiques* et *spirillolytiques* du venin sont liées à une seule et même substance, dont les principaux caractères sont la *thermostabilité* et l'*affinité pour la lécithine*. On sait, d'après des constatations antérieures faites en particulier par Morgenroth, que l'hémolysine du venin, contrairement à la protéolysine et à la neurotoxine résiste à un chauffage à 100 degrés, prolongé pendant 20 minutes. Or, nous avons trouvé que le venin, porté à cette température pendant 5 et 15 minutes, continue à être toxique, non seulement pour les hématies, mais aussi pour les paramécies, les trypanosomes et les spirochètes. *Les propriétés zootoxiques et spirillicides du venin de cobra sont donc, tout comme les qualités hémolysantes, thermostabiles.*

De plus, nous avons établi que les propriétés zoolytiques et spirillolytiques de ce venin sont, comme les qualités hémolytiques, liées à la présence d'une substance ayant une affinité particulière pour la lécithine.

Nous n'insisterons pas ici sur le rôle de la lécithine dans le mécanisme d'action de la cobra-hémolysine. On sait que, peu après la découverte de la réactivation du venin de cobra par le sérum frais ou chauffé à 62 degrés, due

à Flexner et Noguchi ¹ et à Calmette ², Preston Kyes ³ a démontré que cette réaction était attribuable à la présence de lipoides, en particulier de la lécithine dans ce sérum. La lécithine offre une affinité particulière pour la cobra-hémolysine, se combine avec elle (Kyes) pour former un composé stable doué de propriétés hémolysantes. Grâce à une technique particulière, Kyes a réussi à préparer dans le laboratoire d'Ehrlich une lécithide en partant de l'hémolysine du venin de cobra et d'une solution de lécithine dans du chloroforme. Les propriétés de cette lécithide diffèrent sensiblement de celles du venin et de la lécithine, surtout pour ce qui concerne la solubilité, la thermostabilité et l'action neutralisante de l'anti-venin.

Nous avons recherché si les propriétés zootoxiques et spirillolytiques du venin sont liées à une substance offrant la même affinité pour la lécithine que la cobra-hémolysine, en expérimentant avec une cobra-lécithide mise obligeamment à notre disposition par M. le prof. Ehrlich. Nos recherches nous ont montré que la lécithide est non seulement fortement hémolysante ⁴ mais que, de plus, elle immobilise et détruit rapidement les paramécies et les spirochètes de la poule. Ainsi, 0,1 d'une solution à 1/1000 a immobilisé un c. c. d'une culture de paramécies, et 0,1 d'une solut. à 1 0/0 a exercé une action toxique manifeste sur les spirochètes contenus dans 3 gouttes de sang de *Padda* infecté. Il en résulte que les protozoaires et les hématies sont plus sensibles à l'action toxique de la lécithide que les spirochètes.

Ces deux caractères, la thermostabilité et l'affinité, pour la lécithine, permettent donc d'identifier le principe zootoxique et spirillolytique du venin avec la cobra-hémolysine.

Quels sont les arguments qui nous autorisent à établir une distinction marquée entre la bactériolysine du venin et la substance toxique pour les hématies, les protozoaires et les spirochètes? Ils sont de même ordre que les précédents, à savoir la sensibilité à la chaleur et l'affinité pour la lécithine. En effet, Noc et Calmette ont remarqué que cette bactériolysine, contrairement à l'hémolysine, se détruit par un chauffage à 80 degrés et nous avons pu conformer ce fait. Dans nos expériences la dose bactériolytique ⁵ du venin de cobra non chauffé, pour le *Vibrio Cas-*

1. FLEXNER et NOGUCHI, *Journ. of. exp. med.* 1902, vol. VI, n° 3.

2. CALMETTE, *C. R. de l'Ac. des sciences*, 1902, vol. XXXIV, n° 24.

3. KYES, *Berl. klin. Woch.* 1902, nos 38, 39; 1903, nos 42, 43. KYES et SACHS, *Berl. klin. Woch.*, 1903, nos 3 et 4.

4. 0,1 d'une solut. à 1/1000 dissout complètement 2 gouttes de sang de rat.

5. Une anse de culture en gélose, diluée dans 20 c. c. de bouillon. Ensemencement de 5 gouttes dans 2 c. c. de liquide (bouillon-venin).

sino a été de 0,1 d'une solution à 1/1000 (1,020 colonies immédiatement après l'ensemencement, zéro colonies 6 heures après). Le chauffage à 60° pendant un quart d'heure n'a nullement influencé l'action bactéricide du venin, cependant que ce venin, porté pendant le même temps à 80 degrés, a complètement perdu son pouvoir vibriolytique. *L'hémolysine et par conséquent la zootoxine et la spirillolysine sont thermolabiles, cependant que la bactériolysine du venin est relativement thermostable.*

De plus, tandis que l'hémolysine forme avec la lécithine une lécithide active, par contre la bactériolysine offre une affinité de beaucoup moins marquée pour les lipoides. Nous en avons la preuve dans le fait que la cobra-lécithide, tout en étant fortement hémolysante, zootoxique et spirillolytique, ne jouit que d'un pouvoir vibriolytique faible, presque nul.

Exemple :

Lécithine ($\frac{1}{100}$)	Bouillon.	Vibrions.	Immédiatement.	Après six heures.
0,1	1,9	5 gouttes.	1.103 col.	Innombrables.
0,5	1,5	»	180 col.	»
1,0	1,0	»	360 col.	»
—	2,0	»	960 col.	»
Venin ($\frac{1}{100}$)				
0,5	1,5	»	0 col.	0
1,0	1,0	»	1 col.	0

Ces recherches montrent que, si l'on considère *le venin entier*, il est impossible de faire une distinction entre les hématies, les protozoaires et les spirochètes d'une part, les bactéries de l'autre. Il suffit cependant de séparer l'hémolysine de la bactériolysine en s'adressant à l'action de la chaleur ou à l'affinité pour les lipoides, pour constater que ces deux groupes de parasites et cellules se comportent différemment à l'égard de la cobra-hémolysine. En effet, tandis que les globules sanguins, les protozoaires et les spirilles sont détruits par l'hémolysine

thermostables du venin et par la cobra-lécithide, par contre, les vibrions cholériques, bactéries les plus rapprochées des spirochètes, se montrent insensibles vis-à-vis de ces poisons. *Force nous est donc d'admettre l'existence d'une affinité marquée, au point de vue biologique, entre les spirochètes pathogènes, les cellules animales et les protozoaires.*

*
* *

Quelle peut être la raison de cette différence dans la façon de réagir des cellules, des protozoaires et des spirochètes d'une part, des bactéries d'autre part, vis-à-vis de la cobralysine? Nous savons que les poisons hémolysants déterminent la sortie de l'hémoglobine en agissant sur la membrane globulaire, membrane dont la richesse en *lipoides* ne laisse aucun doute ¹. Il a été démontré, d'autre part, que la cobralysine s'attaque aux hématies grâce à l'affinité qu'elle possède pour les *lipoides* ² en général et pour la lécithine en particulier. Il est donc fort possible que, si les cellules ³, les protozoaires et les spirilles sont sensibles à l'égard de l'hémolysine du venin, cela tient précisément à ce qu'ils possèdent une membrane contenant des *lipoides* en quantité suffisante pour réactiver cette hémolysine, ou bien des *lipoides* dans un état de combinaison facile à défaire. Si, d'autre part, les bactéries sont insensibles à l'égard de la cobralysine, cela pourrait être dû à une constitution particulière de leur enveloppe membraneuse, laquelle serait pauvre en *lipoides*, ou contiendrait des lécithines à l'état de combinaison plus stable. Il s'agit là d'une hypothèse dont la vérification expérimentale serait particulièrement importante. En effet, aux différences morphologiques et biologiques déjà connues entre le monde des protistes et celui des bactéries, viendraient s'ajouter des dissemblances dans la constitution chimique de leur membrane.

L'emploi du venin peut, jusqu'à un certain point, résoudre

1. Voir les constatations intéressantes recueillies par Pascucci au laboratoire de Hofmeister.

2. La lécithine n'est pas seule à réactiver le venin. Suivant Noguchi (*Journ. of exp. med.*, 1906, vol. VIII, 1901), Kyes et Sachs (*Berl. klin. Woch.*, 1903, nos 3, 4) et Mayer (*Biochem. Zeitschr.* 1906, vol. I), la trioléine la képhaline et la jécorine possèdent la même propriété.

3. Certaines espèces de globules rouges, p. ex. les hématies du rat et de la souris.

ce problème, car la cobralysine, grâce à son affinité pour les lipoïdes, est un excellent réactif pouvant indiquer la présence de la lécithine dans les produits organiques et aussi l'état dans lequel se trouve ce lipoïde. Comme le fait remarquer H. Sachs ¹, l'emploi de la cobralysine peut nous renseigner sur l'existence de lécithine « disponible » entrant dans la constitution des tissus et des cellules.

Nous avons entrepris une longue série d'expériences dans le but de rechercher s'il était possible de révéler certaines différences entre les bactéries d'une part, les protozoaires, les hématies et les spirochètes de l'autre, en ce qui concerne leur richesse en lipoïdes capables de réactiver la cobralysine. Pour ce faire, nous avons traité ces éléments (aussi isolés que possible) avec de l'éther et nous avons apprécié le pouvoir réactivant de l'extrait éthéré vis-à-vis du venin, en présence des globules rouges de rat et de mouton. A des quantités croissantes de cet extrait éthéré et après évaporation, nous avons ajouté une dose de venin inactive par elle-même, et nous avons apprécié l'intensité de l'hémolyse, ainsi que le temps nécessaire par la dissolution complète des hématies ².

En procédant de la sorte, nous avons constaté *qu'il est facile d'extraire non seulement des hématies, mais aussi des paramécies et des spirochètes de la poule, des substances solubles dans l'éther capables de réactiver le venin de cobra*. Nous donnons comme exemple une expérience de réactivation avec l'extrait éthéré *de spirilles de la poule*.

On recueille, par centrifugations répétées, les spirilles contenus dans le sang d'une poule sacrifiée en pleine infection. Le magma spirillaire ne renferme que peu de globules rouges. On ajoute 20 c. c. d'éther, on agite et on laisse séjourner jusqu'au lendemain. L'éther est décanté et introduit dans des tubes à essais. Evaporation de l'éther au bain-marie (55°), puis à l'étuve à 60°. Après l'achèvement de l'évaporation, on ajoute de l'eau salée et 0,3 d'une sol. de venin à 1 : 100. Les tubes sont maintenus pendant 1/4 d'heure à 38°, après quoi on introduit deux gouttes de sang de mouton, préalablement lavé ³.

1. H. SACHS, *In Handb. der Techn. u. Meth. der Immunitätslehre* (KRAUS et LEVADITI), vol. I, p. 254.

2. D'habitude, nous introduisons des quantités variables de l'extrait éthéré dans des tubes à essai et nous évaporons l'éther dans un bain-marie à 50°, puis à l'étuve (60°).

3. Une expérience de contrôle faite avec une quantité d'hématies égale à celle qui est mélangée au spirochète nous a donné un résultat négatif.

Extrait éthéré.	Venin.	Eau salée.	Après 3 h. à 38°.
2,0	0,3	1,7	Trace.
4,0	0,3	1,7	Complet.
6,0	0,3	1,7	Complet.
6,0	—	2,0	0
Ether pur.			
6,0	0,3	1,7	0
—	0,3	1,7	0
—	—	2,0	0

D'ailleurs, pour ce qui concerne les *paramécies* (cultures centrifugées et lavées), il n'est nullement besoin de les épuiser par l'éther pour mettre en évidence la présence de lipoïdes capables de réactiver le venin. Le contact direct de la cobra-lysine avec ces protozoaires rend cette lysine active pour les hématies de mouton.

Il est donc bien établi que les globules rouges, les protozoaires et aussi les spirilles renferment des lipoïdes possédant des qualités réactivantes vis-à-vis du venin. Comment se comportent, à ce point de vue, les *bactéries* ? Nos expériences ont été concordantes pour prouver qu'*au point de vue de la présence des lipoïdes réactivants, aucune différence ne saurait exister entre ces bactéries et le groupe hématies-protozoaires-spirochètes*. En effet, l'emploi de l'éther nous a permis d'extraire non seulement du vibrion cholérique (*V. Cassino*), mais aussi de la bactériidie charbonneuse des lipoïdes en présence desquelles le venin devenait actif vis-à-vis de certaines espèces d'hématies.

Que faut-il conclure de ces données ? Comme le faisaient déjà prévoir les recherches d'Owerton, il n'y a pas lieu de faire une distinction marquée entre les cellules animales et les cellules végétales au point de vue de la présence de lipoïdes dans la membrane cellulaire. Il est même très probable que tout élément cellulaire contient des lipoïdes en quantité plus

ou moins considérable, et dans un état plus ou moins stable. La séparation que nous venons d'établir entre les hématies, les protozoaires et les spirochètes d'une part, les bactéries d'autre part, au point de vue de leur sensibilité à l'égard de la cobralysine, ne saurait donc tenir à l'absence de lipoides réactivants chez ces derniers. Elle ne peut s'expliquer que de deux façons : soit que ces deux ordres d'éléments possèdent un protoplasma inégalement sensible vis-à-vis de ce poison thermostabile du venin de cobra, soit que les lipoides se trouvent chez les cellules animales et le protozoaire dans un état moins stable que chez les bactéries. Suivant cette dernière hypothèse, les éléments cellulaires, les protozoaires et les spirilles contiendraient des lipoides à l'état de combinaison instable, lipoides qu'ils cèdent facilement dès qu'ils se trouvent en présence du venin. Quoi qu'il en soit, un fait reste bien établi : *c'est la dissemblance entre les spirochètes et les vibrions au point de vue de leur sensibilité à l'égard de la cobralysine.*

III

ACTION DES EXTRAITS D'ORGANES AUTOLYSÉS

Certains extraits d'organes obtenus en faisant macérer les tissus dans de l'eau salée, à 38°, sont doués de propriétés hémolytiques manifestes. Le fait a été établi par Tarasséwitch ¹, qui, en opérant avec des ganglions lymphatiques, a obtenu des extraits hémolysants qu'il croyait identiques avec le complément hémolytique du sérum (*macrocytase*). Cependant, les recherches de Korschun et Morgenroth ² ont démontré que ces extraits ont des qualités hémolysantes différentes de celles du complément hémolytique en ce sens que l'hémolysine des organes est, contrairement à celle du sérum, *thermostabile et soluble dans l'alcool*. Ces constatations, confirmées par Donath et (Landsteiner ³, ont été complétées par les recherches de Levaditi ⁴. Cet auteur a démontré que l'hémolysine thermostabile (*coctostabile*) des macérations des glandes lymphatiques de

1. TARASSÉWITCH, *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, n° 2.

2. KORSCHUN et MORGENROTH, *Berl. klin. Woch.*, 1902, n° 37.

3. DONATH et LANDSTEINER, *Wien. klin. Rundschau*, 1902, n° 40.

4. LEVADITI, ces *Annales*, 1903, vol. XVII, p. 187.

cobaye résulte de l'autolyse aseptique des tissus et doit être identifiée avec les acides gras, les acides amidés et les savons qui se forment au cours de cette autolyse.

Nous avons repris l'étude de ces extraits d'organes au point de vue de leur action non seulement sur les hématies, mais aussi sur les protozoaires, les spirilles et les bactéries et nous sommes arrivés à des conclusions qui confirment les données que nous venons d'énoncer. Nous nous sommes servis pour cela d'*extraits de pancréas et de ganglions lymphatiques*¹ de cobaye, préparés de la façon suivante : les pancréas de trois cobayes saignés à blanc sont triturés finement dans un mortier et suspendus dans 20 à 30 c. c. d'eau salée isotonique. On soumet le mélange pendant 5 heures à 38° et on le conserve jusqu'au lendemain à la glacière. L'extrait est débarrassé de cellules par centrifugations répétées.

Nos recherches nous ont montré que *l'extrait de pancréas de cobaye, préalablement autolysé, est à la fois hémolytique, zootoxique et spirillolytique, cependant qu'il ne jouit d'aucun pouvoir bactéricide*. Ainsi, 0,1 c. c. de cet extrait suffit pour dissoudre complètement (une heure à 38°) 1 c. c. d'une suspension d'hématies de cobaye dans de l'eau salée (1 c. c. sang pour 20 c. c. eau). Dilué de moitié avec de la macération de choux, milieu que nous avons employé pour la culture des paramécies, cet extrait immobilise au bout de 20 minutes ces protozoaires. Sa dose toxique pour les spirochètes du rat (*rec. américaine*) est d'environ 0,5 pour 4 gouttes de sang spirillé. De plus, nous avons constaté que *l'extrait de ganglions lymphatiques jouit des mêmes propriétés que l'extrait de pancréas*, tandis que l'extrait de foie est complètement inactif. Cependant, le pouvoir hémolytique, zootoxique et spirillicide de cet extrait de glandes lymphatiques est sensiblement inférieur à celui de l'extrait pancréatique. Quant aux qualités bactéricides, appréciées vis-à-vis du *Vibrio Cassino*, elles sont nulles, comme le prouve l'expérience suivante :

1. Ganglions mésentériques.

EXTRAIT DE PANCRÉAS DE COBAYE + VIBRIO CASSINO

Extrait.	Bouillon.	Immédiatement.	Après 5 heures.
0,1	1,9	Environ 1,000 colonies.	∞
0,5	1,5		∞
1,0	1,0		∞
1,5	0,5		∞
—	2,0		∞

Nous avons recherché quels sont les principes auxquels ces extraits d'organes doivent leurs propriétés hémolytiques, zootoxiques et spirillicides et nous avons recueilli les constatations suivantes :

Le chauffage préalable à 100° de la macération de pancréas ou de glandes lymphatiques, pratiqué avant l'autolyse, entrave la formation des corps hémolysants, zootoxiques et spirillolytiques thermostabiles. Sous l'influence de la chaleur, le ou les ferments lypolytiques (lipase, steapsine) se détruisent et il ne s'opère nulle transformation des graisses neutres et des lipoides de l'ordre de la lécithine, en acides gras et en savons solubles. Tout porte en effet à croire que les principes hémolysants des extraits d'organes ne sont autres que des acides gras et des savons provenant de l'autolyse de ces graisses et de ces lipoides. En effet, ces principes, comme l'ont vu Korschun et Morgenroth, sont solubles dans l'alcool et très résistants à l'action de la chaleur. D'un autre côté, Noguchi¹ a montré tout récemment que, si l'on ajoute à quelques gouttes de trioléine, de graisse animale ou de beurre une certaine quantité de lipase pancréatique, on provoque la formation de composés hémolytiques que l'on doit identifier avec les acides gras et les savons. Ces derniers sont d'ailleurs fortement toxiques pour les hématies de quelques espèces animales.

Nous avons nous-mêmes examiné cette question, et nous avons trouvé que *certaines acides gras, en particulier l'acide oléique, agissent non seulement sur les globules rouges, mais aussi sur les paramécies, les trypanosomes du*

1. NOGUCHI, *Biochem. Zeitsch.* 1907, vol. VI, p. 185; *Journ. of. experim. med.* 1907, vol. IX, p. 436.

Surra et les *spirochètes* de *Marchoux* et *Salimbeni*. Il en est de même des savons solubles, tel l'*oléate de soude*, qui possèdent des qualités hémolytiques, zootoxiques et spirillolytiques plus accusées même que celles des acides gras correspondants¹.

En outre, en nous servant de la méthode employée par Faust et Tallquist² pour l'isolement de l'hémolysine de l'extrait de *Bothriocephalus latus*, nous avons pu retirer des macérations autolysées de pancréas et de glandes lymphatiques, des savons et des acides gras (mélange d'acide oléique et palmitique, avec prédominance du premier) qui se sont montrés actifs vis-à-vis des hématies, des trypanosomes et des spirochètes. Ces acides et les savons correspondants ont été plus abondants dans l'extrait de pancréas que dans la macération des glandes lymphatiques de cobaye, ce qui concorde avec l'activité hémolytante et zootoxique de ces deux extraits.

En résumé, sous l'influence des ferments lypolytiques contenus dans le pancréas et très probablement aussi dans les glandes lymphatiques, les graisses neutres et les lipoides en général (lécithine), contenus dans ces tissus, se dissocient pour mettre en liberté des acides gras, lesquels ne tardent pas à former des savons solubles. L'autolyse des graisses et des lipoides amène ainsi la formation des substances chimiquement bien définies, qui sont douées de propriétés à la fois hémolysantes, zootoxiques et spirillolytiques.

Or, lorsqu'on examine les qualités bactéricides vis-à-vis du vibron cholérique de ces extraits d'organes, ou des savons alcalins (oléate de soude), on constate qu'il est nul ou peu s'en faut. Voici une expérience qui le démontre :

OLÉATE DE SOUDE, SOLUTION A 1 0/0 + VIBR. CASSINO

Oléate.	Bouillon.	Immédiatement.	Après 5 heures.
1,0 } $\frac{1}{100}$	1,0	Environ 1,000 colonies.	∞
0,5 } $\frac{1}{100}$	1,5		∞
1,0 } $\frac{1}{1,000}$	1,0		∞
0,5 } $\frac{1}{1,000}$	1,5		∞
—	2,0		∞

1. Nous avons trouvé qu'au point de vue de l'action des acides gras et des savons, les paramécies sont plus résistantes que les trypanosomes. Cela tient probablement à la réaction légèrement acide du milieu de culture de paramécies.

2. FAUST ET TALLQUIST, *Arch. für exp. pathol.*, vol. LVII, fasc. 6; 1907, p. 367.

D'après les recherches toutes récentes de Landsteiner et H. Ehrlich ¹, l'*acide oléique* exerce une influence bactéricide manifeste vis-à-vis de la bact. charbonneuse et le *Vibr. Massauah*. Cependant, comme nous venons de le voir dans nos expériences, l'oléate de soude, employé à des doses sûrement toxiques pour les hématies, les protozoaires et les spirilles, ne s'oppose nullement au développement du vibron Cassino.

Ces recherches montrent donc que, conformément à ce que l'on observe avec les glucosides, le taurocholate de soude (Neufeld et Prowazek) et le venin de cobra, les hématies, les protozoaires et les spirochètes se comportent différemment des vibrions cholériques, au point de vue de leur sensibilité à l'égard des extraits d'organes et des savons solubles. Mais il y a plus.

On sait que les *extraits de leucocytes polynucléaires* renferment des principes jouissant de propriétés bactéricides manifestes vis-à-vis des vibrions, du b. typhique et d'autres bactéries. Or, en expérimentant avec ces extraits (*leucocyte de lapin*), nous avons constaté que, tout en étant bactériolytiques pour le *V. Cassino* et le *b. d'Eberth*, ils sont complètement inactifs à l'égard des hématies, des protozoaires et des spirochètes.

EXEMPLE. — Les leucocytes polynucléaires de l'exsudat pleural, provoqué chez 3 lapins en injectant du Mellin's food, sont isolés par centrifugation dans des tubes paraffinés et lavés une fois. On les suspend dans 10 c. c. d'eau salée, on les congèle et décongèle à plusieurs reprises, on les laisse macérer 5 heures à 38° et on les conserve jusqu'au lendemain à la glacière. L'extrait clair obtenu par centrifugation est employé par des expériences de bactériolyse, de zootoxie et de spirillolyse.

1. LANDSTEINER ET H. EHRLICH, *Centrbt für Bakt.* 1907, vol. XLV, fasc. 3, p. 247.

POUVOIR BACTÉRICIDE DE L'EXTRAIT DE LEUC. POLYNUCLÉAIRES

Extrait.		Bouillon.	Immédiatement.	Après 5 heures.
Bac. d'Eberth.	0,4	0,9	Environ 2,500 colonies	∞
	0,5	4,5		∞
	4,0	1,0		800
	4,5	0,5		20
	—	2,0		∞
Vibrio Cassino.	0,4	4,9	Environ 2,000 colonies	∞
	0,5	4,5		Environ 4,000
	4,0	4,0		0
	4,5	0,5		Environ 100
	0	2,0		∞

L'extrait n'agit en aucune façon sur les trypanosomes (Surra), les spirochètes de la poule et les hématies de cobaye.

Ces données montrent que, tandis que les extraits autolysés de globules blancs mononucléaires (ganglions lymphatiques) renferment des substances thermostables hémolytiques, zootoxiques et spirillolytiques, par contre les extraits de leucocytes polynucléaires, tout en étant bactériolysants¹, n'ont aucune action sur les cellules animales, les protozoaires et les spirochètes. On ne peut s'empêcher de faire un rapprochement entre ces constatations et le fait que, dans l'organisme vivant, ce sont précisément surtout les polynucléaires qui englobent et détruisent les bactéries, cependant que la destruction phagocytaire des hématies, des protozoaires et aussi des spirochètes est exercée plus spécialement par les macrophages (Metchnikoff). Quoi qu'il en soit,

1. En traitant par la méthode de Faust et Tallquist des extraits de polynucléaires (extraction par l'alcool, saponification avec NaOH (sol. normale), acidification, extraction par l'éther), nous avons obtenu des extraits qui dissolvaient faiblement les hématies de cobaye. Il s'agit très probablement d'une formation d'acides gras et de savons au dépens des lipoides analogues à la lécithine. L'extrait alcoolique simple de leucocytes polynucléaires est inactif vis-à-vis des hématies, des protozoaires, des spirochètes et des bactéries.

nous devons conclure de toutes ces expériences que, *au point de vue de la sensibilité à l'égard des poisons hémolysants, les hématies, les protozoaires et les spirochètes constituent un groupe homogène se rapprochant, à cet égard, plus des protozoaires que des bactériacées.* Conformément à une conception avancée déjà par Caullery et Mesnil¹ et par Dofflein², nous sommes enclins à envisager les spirochètes comme des organismes faisant transition entre le monde des protozoaires et celui des bactériacées.

Janvier 1908.

1. CAULLÉRY et MESNIL, *Revue générale des sciences*, 1906 (v. page 91).

2. DOFFLEIN, *Rapport au Congrès d'hygiène de Berlin*, sept. 1907.

Etude expérimentale sur le sort de la toxine tétanique dans le tube digestif

PAR M. H. VINCENT

Médecin-major de 1^{re} classe, professeur au Val-de-Grâce.

I

On a signalé depuis longtemps que les animaux peuvent ingérer des doses énormes de toxine tétanique sans effets dangereux. D'autre part, le bacille de Nicolaïer vit dans l'intestin des herbivores sans, cependant, donner lieu au tétanos. La présence, dans le tube digestif, et l'innocuité habituelle des produits de sécrétion d'un grand nombre de bactéries, pathogènes ou non, ont suscité des interprétations très différentes. La plupart des recherches opérées en vue d'éclaircir ce problème ont été faites avec les venins. Cependant, Gibier, Charrin, Lefèvre, Ransom, Nencki, Sieber et Schoumow-Siemanowski, Carrière, ont également étudié pourquoi diverses toxines microbiennes : pyocyanique, diphtérique, tétanique, sont inoffensives par la voie digestive.

Les hypothèses, souvent contradictoires, proposées pour expliquer l'immunité digestive, se ramènent aux suivantes :

1^o La muqueuse intestinale retient ou détruit les toxines grâce aux propriétés de son épithélium; le foie complète son œuvre (Gibier, Charrin);

2^o Les microbes contenus dans l'intestin participent à cette destruction (Lefèvre);

3^o Les toxines sont à peine modifiées par leur passage à travers l'intestin. L'épithélium ne les détruit pas; la toxine tétanique dialyse intégralement à travers les parois de l'intestin. Le mécanisme de sa destruction est donc incertain (Carrière);

4^o Pour Ransom, les toxines sont simplement expulsées avec les matières fécales sans être absorbées ni modifiées pendant leur parcours dans l'intestin.

Cependant, l'action antagoniste des sécrétions du tube digestif a paru vraisemblable à plusieurs auteurs. Charrin et Lefèvre

ont vu que la pepsine additionnée de HCl à 3/1000 atténue beaucoup la toxicité du poison diphtérique. Enfin Nencki, Sieber et Schoumow ont fait des recherches desquelles il résulte que la bile, le suc pancréatique et surtout le mélange de ces deux dernières sécrétions ont une action atténuante ou destructive sur la toxine tétanique.

Dans les recherches qui vont suivre, je me suis proposé en premier lieu de vérifier *in vivo* ce que devient la toxine tétanique dans chacun des trois segments principaux du tube digestif : estomac, intestin grêle, gros intestin; en second lieu, quelle est l'action qu'exercent *in vitro*, sur cette toxine, les divers sucs : gastrique intestinal, pancréatique et biliaire.

II

A. *Sort de la toxine tétanique dans l'estomac.* — On lie le pylore à plusieurs cobayes à jeun depuis dix-huit à vingt heures et on introduit dans leur estomac, par la voie buccale et à l'aide de la sonde, 2 à 3 c. c. de toxine tétanique. Les animaux sont sacrifiés après 1 à 3 heures.

Chaque fois, l'estomac a été trouvé contenant une plus ou moins grande quantité de bouillie alimentaire jaunâtre, de réaction acide¹. Le contenu stomacal était additionné d'eau distillée, filtré sur bougie et injecté à doses massives à plusieurs cobayes et souris.

Aucun des animaux ayant reçu ce filtrat stomacal n'a présenté de symptômes de tétanos, bien que la quantité de toxine introduite dans l'estomac ait été de 1,000 à 1,500 doses mortelles pour le cobaye.

Pour éprouver si, dans les expériences précédentes, la toxine n'aurait pas été retenue par la paroi stomacale et, en particulier, par la muqueuse, on a sacrifié l'animal une heure après l'ingestion de la toxine; on a détaché, vidé et haché l'estomac. Le tout a macéré pendant deux heures, à la glacière, dans l'eau distillée.

Or le filtrat sur porcelaine de cette macération n'a manifesté aucun pouvoir tétanigène.

¹. La constatation d'aliments chez certains animaux à jeun n'est pas un fait exceptionnel. Le lapin tué même après plusieurs jours d'abstinence a encore des aliments dans son estomac. On en trouve, même si on le laisse mourir de faim (Cl. Bernard, Van Helmont).

En conséquence, et à moins qu'elle ne soit évacuée immédiatement dans l'intestin par les contractions gastriques, la toxine introduite dans l'estomac est détruite sur place en moins d'une heure.

B. *Que devient la toxine tétanique dans l'intestin?* — Dans ses expériences, Carrière lie une anse intestinale de 10 à 15 c. c., chez le lapin, et à travers la ligature supérieure il fait pénétrer du venin ou de la toxine tétanique. Les lapins ayant reçu le venin meurent à peu près aussi vite que les témoins injectés sous la peau. Il en conclut qu'il n'y a pas eu destruction du venin, soit par l'épithélium intestinal, soit par les bactéries.

Pour la toxine tétanique, il opère de même entre deux ligatures et, après 24 heures, il filtre le contenu sur papier et l'injecte à un animal : celui-ci meurt presque aussi vite que les témoins.

Dans d'autres essais, il détache entièrement, chez un lapin, un segment intestinal qu'il lave avec du sérum artificiel chloroformé et tiède; puis, après l'avoir lié, il y introduit soit du venin, soit de la toxine. L'anse intestinale fermée est placée dans 10 c. c. d'eau stérilisée et chloroformée, à la température de 40°. Après 24 heures, il constate que le liquide dialysé est toxique. L'auteur admet, dès lors, que l'épithélium intestinal ne retient pas et ne détruit pas le venin ou la toxine.

La technique employée dans ces expériences, ainsi que l'intervention des bactéries intestinales (inoculation du liquide filtré sur papier ou dialysé à travers l'intestin), est de nature à modifier beaucoup leurs résultats.

J'ai injecté directement dans le duodénum de plusieurs cobayes anesthésiés à l'éther 2 à 5 c. c. de toxine tétanique. Une ligature protectrice empêchait le reflux, dans l'estomac ou dans le péritoine, du liquide toxique. Après deux ou trois heures, on sacrifie les animaux, on prélève leur intestin *tout entier* et l'on fait deux parts, l'une de son contenu, l'autre de sa paroi. On joint à la première les excréments solides, peu abondants, rendus depuis l'opération.

L'intestin et son contenu sont finement hachés séparément et mis à macérer pendant deux heures, à la glacière, dans 20 cent. cubes d'eau distillée. On filtre ensuite sur bougie le liquide centrifugé et on injecte le double filtrat, à dose massive,

dans le péritoine de plusieurs cobayes; deux souris reçoivent également 1 c. c. du même liquide.

Aucun des animaux ayant reçu ces filtrats n'a présenté de symptômes tétaniques, bien que la quantité de toxine introduite dans l'intestin des cobayes vivants ait été de plus de 3,000 doses mortelles.

C. *La toxine dans le gros intestin.* — Gibier a signalé ce fait intéressant, que l'on peut introduire impunément dans le rectum des animaux des doses énormes de toxine tétanique. Selon cet auteur, la muqueuse rectale retient les toxines si elle ne les détruit pas. J'ai répété cette expérience chez le lapin et le cobaye, avec un résultat semblable.

Que devient la toxine? Un fort cobaye étant fixé sur le dos et laparotomisé, on fait une ligature sur le gros intestin, à 20 cent. environ au-dessus de l'anus. A l'aide d'une sonde placée dans le rectum, on injecte 3 à 5 cent. cubes de toxine dans le segment inférieur du gros intestin, en liant solidement celui-ci près de l'anus pour éviter le rejet du liquide par les voies naturelles.

L'animal est ensuite suturé et maintenu dans un endroit tiède pendant 2 ou 3 heures, au bout desquelles il est sacrifié. On enlève le segment du gros intestin dans lequel a été introduite la toxine, on met à part son contenu, on hache l'un et l'autre, on additionne d'eau distillée, on filtre et on injecte séparément les deux liquides à des cobayes neufs. Dans ces conditions, on constate qu'il est impossible de retrouver la moindre trace de la toxine, soit dans le contenu intestinal, soit dans sa paroi.

De cette série d'expériences, il est donc permis de conclure, dès à présent, que la toxine tétanique est susceptible de perdre son activité, après un séjour très bref, *dans l'une quelconque des régions de la portion sous-diaphragmatique du tube digestif.*

*
* *

Il est légitime de se demander quelle est la nature de la transformation que subit cette toxine, et quel en est le mécanisme. La toxine est-elle éliminée avec les fèces, ainsi que l'a admis Ransom? Il ne peut en être ainsi, puisque, chez un animal ayant reçu dans le duodénum une forte quantité de toxine, celle-ci n'a pu être retrouvée ni dans les excréments ni dans le contenu intestinal tout entier.

Peut-on admettre, avec Carrière, que l'intestin se laisse traverser en nature par la toxine? Dans cette hypothèse, et si la toxine ou les venins dialysaient à travers la paroi intestinale, chez le vivant, la mort par tétanos ou envenimation devrait évidemment être la règle, ce qui n'est pas.

La muqueuse ou la paroi intestinales ont-elles *retenu* la toxine? Il n'en est rien. On a vu, en effet, que si on sacrifie un animal ayant reçu, dans le duodénum, plusieurs centimètres cubes de poison tétanique, et qu'on injecte à des cobayes ou des souris la macération faite à froid de l'intestin tout entier, cette injection ne se montre nullement tétanigène pour des animaux cependant très réceptifs.

Enfin, on peut être conduit à attribuer la disparition de la toxine aux qualités spéciales de l'épithélium intestinal qui aurait la propriété de la *détruire* ou de la *neutraliser*. L'expérimentation ne m'a pas permis de vérifier l'exactitude de cette hypothèse.

Plusieurs cobayes ayant été sacrifiés en pleine santé, on enlève la totalité de l'intestin dont on fait deux parts : intestin grêle et gros intestin. L'un et l'autre sont rapidement ouverts, vidés et lavés à l'eau physiologique. On racle la muqueuse et on la broie dans un mortier avec du sable stérilisé. Le tout est mis à macérer avec de l'eau distillée, pendant quelques heures et à la glacière. On filtre ensuite sur bougie les deux macérations. Leur filtrat, additionné de toxine tétanique, est porté à l'étuve à 39°.

Or les prélèvements du mélange de toxine et d'extrait aqueux de l'épithélium de l'intestin grêle, aussi bien que du gros intestin, se sont toujours montrés tétanigènes, même après 24 heures de contact; tous les animaux à qui on les a injectés sont morts dans un bref délai.

Il ne semble donc pas que l'épithélium intestinal ait la propriété, dans les conditions précitées, de neutraliser le poison tétanique.

Le même essai fait avec la paroi entière de l'intestin (muqueuse et couche musculo-celluleuse) n'a pas davantage permis de vérifier ses propriétés antitoxiques.

La toxine tétanique n'est donc ni atténuée, ni détruite par l'une quelconque des couches constituant la paroi de l'intestin.

L'hypothèse émise par Lefèvre, à savoir celle de la destruction des toxines par les bactéries de l'intestin, ne semble pas pouvoir être admise. Fermi et Pernossi ont vu qu'un grand nombre de microbes sont sans action sur la toxine tétanique. D'après Carrière, les bactéries l'atténuent sans la détruire. Du reste, l'action de ces bactéries sur la toxine peut être étudiée *in vitro*. On ensemence dans un tube de bouillon une parcelle du contenu intestinal de cobaye ou de lapin; on porte à l'étuve et, après 24 heures, on introduit dans cette culture impure où les anaérobies ont également poussé dans la profondeur, 50 à 100 doses mortelles (pour le cobaye) de toxine tétanique pour 10 c. c. de culture. Deux heures après, on filtre sur bougie: l'injection du filtrat a toujours déterminé le tétanos chez le cobaye. Parfois, la toxine a été un peu affaiblie.

Les microbes de l'intestin ne prennent donc qu'une part incomplète dans la disparition de la toxine.

Dès lors, une seule interprétation possible se présente: c'est que, pendant son parcours dans l'estomac et dans l'intestin, la toxine entre nécessairement en rapport avec les sécrétions des glandes digestives et que celles-ci exercent, à son égard, une action antitoxique.

C'est le point qu'il reste maintenant à vérifier.

III

A. *Action du suc gastrique sur la toxine tétanique.* — Charrin et Lefèvre ont pensé que la sécrétion gastrique est capable de modifier la toxicité des poisons microbiens. D'après Carrière, la pepsine dissoute dans une solution de HCl à 2 p. 1000 atténue considérablement la toxine, en 24 heures, à la température de 40°.

Enfin Nencki, Sieber et Schoumow-Siemanowski ont démontré que le suc gastrique possède une propriété atténuante semblable.

Dans mes expériences, j'ai utilisé du suc gastrique frais, de chien, que M. le Dr Frémont, de Vichy, a bien voulu m'envoyer; je le remercie très vivement de son extrême obligeance.

Ce suc gastrique s'est montré très actif à l'égard de la toxine tétanique¹.

On a mis en présence, dans un série de tubes, 1 c. c. de suc gastrique et une proportion de toxine égale à 50 ou 100 doses mortelles pour le cobaye. Le tout a été porté à l'étuve à 38°-39°. Des prélèvements étaient faits toutes les demi-heures et le mélange était injecté à des cobayes. Ce mélange s'est montré inerte déjà au bout de la première demi-heure.

Même lorsqu'on a ajouté une forte quantité de toxine (volume égal de celle-ci et de suc gastrique), le pouvoir tétanigène est annihilé en moins de trente minutes.

Chauffé à 65° pendant trente minutes, pour en détruire la pepsine, le suc gastrique a néanmoins inactivé la toxine en moins d'une heure, sans doute en raison de l'action propre de l'acide chlorhydrique sur la toxine.

Le suc gastrique possède donc des propriétés antitoxiques très notables. Comme les expériences ci-dessus ont été faites en dehors de l'intervention de la muqueuse stomacale, il semble bien établi que la disparition de la toxine dans l'estomac n'est due ni à son absorption, ni à sa rétention par cette muqueuse, mais que la sécrétion physiologique des glandes gastriques suffit à la neutralisation de cette toxine.

B. Influence de la sécrétion biliaire sur la toxine tétanique. — Introduite dans l'intestin, la toxine entre en contact avec la bile, le suc intestinal et la sécrétion pancréatique.

La sécrétion biliaire, bien qu'activée par l'alimentation, est normalement continue. La quantité qui en est évacuée dans l'intestin est considérable puisqu'elle atteint un kilogramme, chez l'homme (Bouchard), et chez le chien, 10^{gr}.5 par kilo et par jour (Dastre). La circulation entéro-hépatique ramène ce liquide au foie.

J'ai additionné une certaine quantité de toxine à de la bile d'homme, de bœuf, de chien, de lapin ou de cobaye. Ce mélange perd tout pouvoir tétanigène au bout de 15 à 20 minutes à 48°; de 30 à 40 minutes à 38°-39°; de 2 heures à 16°-18°. En moyenne, 1 c. c. de bile neutralise de 20 à 50 doses mortelles pour le

1. Le titrage de son acide chlorhydrique y a décelé une proportion élevée de cet acide : 3,9 pour 1000.

cobaye, dans les délais ci-dessus. La bile¹ s'est montrée à peu près aussi active, quelle que soit son origine (hommes morts de maladies aiguës ou chroniques; animaux sains ou malades; animaux tétaniques).

D'après Vincenzi, la bile des animaux normaux ne posséderait aucun pouvoir neutralisant sur la toxine tétanique. Ces résultats, non concordants avec les miens, s'expliquent, sans doute, parce que cet auteur employait de trop fortes proportions de toxine. Si, en effet, dans certains cas, le pouvoir antitoxique de 1 c. c. de bile a atteint, dans mes essais, 100 doses mortelles (pour le cobaye), il n'a jamais dépassé ce taux.

Chacun des principaux éléments composants de la bile participe aux propriétés antitoxiques de celle-ci. J'ai préparé des solutions de sels biliaries, de palmitate de soude, de cholestérine et de lécithine aux titres indiqués par les auteurs dans l'analyse chimique de la bile, savoir :

Glycocholate de soude	à 4,85 p. 100 (Ritter).
Taurocholate —	à 2,51 — (id.).
Palmitate —	à 1,39 — (Hoppe Seyler).
Cholestérine (sol. étherée)	à 0,35 — (id.).
Lécithine (id.)	à 0,53 — (id.).

1 c. c. de ces solutions a successivement été mélangé avec 20 doses mortelles de toxine. Toutes ces substances ont manifesté un pouvoir neutralisant évident : après 30 à 40 minutes, à la température de 38°, chaque mélange est devenu inoffensif.

Si, afin de préciser quel est, parmi les constituants biliaries, celui qui réclame la plus grande part dans les propriétés antitoxiques de la bile, on augmente la proportion de toxine ajoutée à chaque solution, on constate que les glycocholate et taurocholate de soude, ainsi que la lécithine, sont, *aux titres indiqués ci-dessus*, impuissants à neutraliser 220 à 250 doses mortelles pour le cobaye.

Injectés avec le mélange de cholestérine et de toxine à cette dose élevée, les cobayes n'ont eu qu'un tétanos tardif et fugace.

1. Quelle que soit son origine (animaux sains, malades ou tétaniques), la bile, injectée sous la peau, n'a aucune propriété préventive ou thérapeutique contre le tétanos : elle paraît, cependant, atténuer pendant quinze à trente minutes les spasmes et les contractures. Mais la maladie suit ultérieurement son cours.

La ligature préventive du cholédoque, chez le chien à qui on inocule, quelques jours tard, trois doses mortelles de toxine, retarde un peu l'apparition du tétanos toujours fatal. Le chien dont le cholédoque est ligaturé ou sectionné n'a, il est vrai, qu'un ictère léger.

Enfin les animaux ayant reçu 1 c. c. du mélange de palmitate de soude et de toxine (220 à 250 doses mortelles) n'ont présenté aucun symptôme anormal.

Le cholestérine et les savons biliaires sont donc, vis-à-vis de la toxine tétanique, les principes les plus antitoxiques de la bile. La lécithine et les sels biliaires ont une efficacité moindre. Le taurocholate de soude possède le pouvoir le plus faible ¹.

Les pigments biliaires paraissent n'avoir qu'une action antitoxique minime. En effet, la bile de cobaye, qui en est à peu près dépourvue, a montré un pouvoir neutralisant aussi grand que la bile de bœuf.

D'autre part, Dastre et Floresco ont établi l'existence, dans la bile, d'une oxydase thermolabile. Celle-ci participe, sans doute, aux propriétés antitoxiques de la bile, car le poison tétanique est très sensible aux agents d'oxydation; d'autre part, le chauffage à 100°-120° ou le vieillissement de la bile, fraîche diminuent manifestement, quoique dans une faible mesure, l'action neutralisante de la bile sur la toxine tétanique.

On peut conclure de ces expériences que la bile joue un rôle important dans la destruction de la toxine tétanique dans l'intestin.

C. *Influence des sécrétions pancréatiques et intestinales sur la toxine.* — Je dois à l'obligeance de M. A. Frouin, du laboratoire de M. Délezenne, à l'Institut Pasteur, le suc pancréatique et le suc intestinal de chien dont je me suis servi. Je lui adresse mes vifs remerciements.

J'ai fait les essais suivants : une quantité de toxine égale à 100 doses mortelles pour le cobaye est ajoutée à :

a. — 1 c. c. de suc pancréatique ;

b. — 1 c. c. de suc intestinal ;

c. — 1 c. c. de suc pancréatique + 1/2 c. c. de suc intestinal ;

d. — 1 c. c. de suc pancréatique + 1/2 c. c. de suc intestinal + 1/2 c. c. de bile.

Ces quatre mélanges sont abandonnés, pendant 4 heures,

1. Lorsqu'elle est mise en rapport avec la cholestérine, la lécithine, les savons ou les sels biliaires, la toxine semble détruite ou fortement fixée par ces substances. Il n'a pas été possible, en effet, de séparer nettement la toxine du mélange, soit par l'action précipitante du phosphate disodique et du chlorure de calcium, soit par l'alcool absolu, l'acétate de plomb (glycocholate de soude) etc., ou par la dialyse (sels biliaires). Les animaux à qui on injecte les divers précipités présentent cependant, parfois, pendant un ou deux jours, un léger degré de raideur.

à 18°-20°, ou à 38° pendant 30 minutes. On les injecte ensuite à autant de cobayes. Le cobaye témoin, ayant reçu la toxine seule, a eu le tétanos au bout de 30 heures et en est mort un jour après. Pour les autres, le résultat a été le suivant :

Cobaye ayant reçu le mélange *a* : début de tétanos au 3^e jour (retard appréciable sur le témoin); mort en 48 heures.

Cobaye *b* : début du tétanos au troisième jour (même remarque que ci-dessus); forme un peu prolongée de l'affection. Mort au 5^{me} jour ;

Cobaye *c* : *pas de tétanos* ;

Cobaye *d* : *pas de tétanos*.

Cette expérience a été faite à plusieurs reprises avec les mêmes résultats.

En conséquence, le suc pancréatique frais et le suc entérique frais ont, isolément, sur la toxine, une action légèrement atténuante. Par contre, leur mélange est très antitoxique, surtout à la température de 38°.

Quelle que soit l'influence neutralisante du mélange de suc pancréatique et d'entérokinase, elle n'est pas, cependant, illimitée. Le mélange composé de 3/4 de c. c. de suc pancréatique et de 1/4 de c. c. de suc intestinal neutralise, au maximum, 400 à 500 doses mortelles pour le cobaye.

Si l'on compare l'activité antitoxique de la bile, dont il a été question plus haut, à celle du suc pancréatique activé, le pouvoir de ce dernier est environ trois à cinq fois plus énergique que celui de la bile. Celui du suc gastrique est à peu près équivalent au pouvoir du mélange du suc pancréatique et d'entérokinase.

IV

Les modes d'action, sur la toxine tétanique, du suc gastrique et du suc pancréatique activé sont vraisemblablement analogues : il s'agit, dans l'un comme dans l'autre cas, d'un phénomène de digestion de la toxine.

Si, en effet, avant d'ajouter la toxine, on neutralise le suc gastrique à l'aide d'une solution de soude, on enlève à ce suc gastrique tout son pouvoir antitoxique. L'injection d'une quantité même faible de son mélange avec la toxine, au bout de 2 heures et 4 heures, à la température de 38°, provoque le tétanos

aussi rapidement que chez l'animal témoin. La pepsine perd, en effet, ses propriétés digestives dans un milieu neutre ou alcalin.

Si on ajoute de nouveau une quantité de HCl égale à celle qu'on a neutralisée, le suc gastrique récupère son pouvoir antitoxique.

La sécrétion physiologique pure du pancréas ne possède, comme on sait, aucune action digestive sur les albuminoïdes : mais l'addition d'une faible quantité de kinase intestinale lui communique un pouvoir protéolytique considérable.

Or, pareillement, la toxine tétanique n'est pas détruite par le suc pancréatique seul. Il faut l'intervention simultanée de l'entérokinase pour amener la destruction de la toxine.

Il y a donc un parallélisme remarquable entre le pouvoir antitoxique et le pouvoir digestif du suc pancréatique.

D'ailleurs, si on chauffe à 63°, pendant 30 minutes, le suc pancréatique seul ou activé, et qu'on lui ajoute ensuite une quantité même très faible de toxine, celle-ci conserve tout son pouvoir tétanigène, même après un contact de quatre heures à 38°. Le chauffage isolé du suc intestinal donne le même résultat.

Ainsi qu'on le voit, le même facteur (la chaleur) supprime simultanément la propriété protéolytique et l'action antitoxique du suc pancréatique.

Le rapprochement peut être poussé plus loin. Dans ses importantes recherches sur la digestion des albuminoïdes par le suc pancréatique, Delezenne a montré que le suc pancréatique peut être activé, en l'absence d'entérokinase, par le chlorure de calcium à faible dose. Le même phénomène va-t-il se produire si, au cube d'albumine, on substitue la toxine tétanique?

Dans un certain nombre de tubes contenant un cent. cube de suc pancréatique, on ajoute 0 c. c. 15, 0 c. c. 20, 0 c. c. 25, etc... d'une solution de CaCl_2 à 5 p. 0/0. Le tout est mis à l'étuve pendant 45 minutes, puis centrifugé pour se débarrasser du précipité. On verse ensuite dans chaque tube deux gouttes de toxine. Les tubes sont reportés à l'étuve.

Toutes les heures, on injecte le contenu de chaque tube à un cobaye. Or, à partir de la 6^{me}-7^{me} heure de contact, le mélange, qui jusqu'alors était resté tétanigène, a perdu brusquement son action toxique et a continué à se montrer inactif.

La destruction de la toxine s'est donc manifestée exactement dans les mêmes conditions qui ont été signalées par Delezenne à l'occasion du pouvoir digestif du suc pancréatique activé par le chlorure de calcium.

Il semble donc bien que la disparition ou la destruction de la toxine soumise à l'influence du suc pancréatique résulte d'un véritable processus de digestion de cette toxine.

*
* *

Dans son passage à travers la portion sous-diaphragmatique (la seule absorbante) du tube digestif, la toxine tétanique perd donc toute son activité dès quelle se trouve en rapport avec les sécrétions de l'estomac, du foie, de l'intestin et du pancréas. Prise individuellement, chacune de ces sécrétions annihile en trente minutes, et même moins, des proportions énormes de toxine.

On peut donc conclure de ces recherches que le tube digestif, dans son entier, est admirablement protégé contre l'influence malfaisante de certaines toxines microbiennes ; chacun de ses segments est apte à les neutraliser *in situ*, grâce à ses sécrétions. Ainsi s'explique l'innocuité absolue de la toxine tétanique lorsqu'elle est introduite, même à dose considérable, dans les voies digestives.

Certains auteurs ont admis que le microbe du tétanos se multiplierait dans l'intestin des herbivores. S'il en est ainsi, ce qui n'est pas, cependant, démontré, la toxine sécrétée par le bacille de Nicolaïer serait rapidement annihilée, au fur et à mesure de sa production, par les ferments digestifs et par la sécrétion biliaire.

Il paraît, d'ailleurs, vraisemblable que la plupart des toxalbumines et des poisons solubles, d'origine complexe, qui prennent naissance dans l'intestin sous l'influence de la multiplication des bactéries qui y foisonnent, sont détruits ou rendus inoffensifs par un processus semblable à celui qui vient d'être établi pour la toxine tétanique. C'est, du reste, une question que je me propose d'étudier prochainement.

Sur la vaccination contre la peste par le tube digestif

VOIE GASTRIQUE ET VOIE RECTALE

PAR LE D^r GIUSEPPE FORNARIO

(Institut Pasteur de Lille.)

Sur le conseil de M. Calmette, j'ai cherché à réaliser la vaccination contre la peste par le tube digestif.

Déjà en 1902, *Mercatelli*¹ avait eu l'idée d'utiliser la voie gastrique pour immuniser le cobaye. La méthode employée par cet auteur consistait à faire absorber aux animaux, avec leur nourriture ou avec la sonde stomacale, une seule dose de culture en bouillon chauffée à 60° pendant soixante minutes. Dans quelques cas seulement les résultats obtenus furent positifs. J'ai répété ces expériences en employant des cultures sur gélose émulsionnées et chauffées pendant le même temps. Or en variant la quantité de microbes ingérée en une seule fois, aussi bien qu'en répétant plusieurs fois ces ingestions à plusieurs jours d'intervalle, je n'ai pu conférer l'immunité à aucun de mes animaux.

Il était donc nécessaire de reprendre l'étude de cette question en déterminant tout d'abord les conditions de l'infection par les voies digestives (voie stomacale et voie rectale) et en essayant ensuite de suivre, par la mesure de l'index opsonique et par la réaction de Bordet-Gengou, les effets de l'introduction directe, soit dans l'estomac, soit dans le rectum, de cultures virulentes, puis de cultures chauffées à différentes températures ou de bacilles pesteux sensibilisés par la méthode de *Besredka*².

C'est cette étude que je me suis proposé d'effectuer.

1. *Riforma medica*, 1902, vol. III, n° 31, p. 362.

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, p. 918.

*
* *

A. *Cultures virulentes*. — Pour toutes mes expériences j'ai employé un bacille pesteux (origine de Blidah) obligeamment fourni par M. J. Binot et provenant des collections de l'Institut Pasteur de Paris. Ce bacille n'a jamais passé par aucune espèce animale.

Les cultures faites sur bouillon de veau gélosé et âgées de 24 heures étaient émulsionnées avec 4 c. c. d'eau salée physiologique pour chaque tube. Leur introduction dans l'estomac ou dans le rectum des lapins ou des cobayes se faisait toujours à la sonde, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter de blesser les muqueuses. Pour les rats, on préparait une pâte alimentaire constituée par un mélange de fromage et de mie de pain. Cette pâte, stérilisée à l'autoclave, était imprégnée de bacilles virulents ou chauffés, et donnée comme unique nourriture aux animaux.

Par voie hypodermique, la culture virulente tuait en 3 jours le rat blanc à la dose de 1/200 de culture. Par voie stomacale (l'animal étant toujours à jeun), la dose sûrement mortelle en 6 à 7 jours était de 1/10 de culture.

Les cobayes succombaient en 3 jours avec 1/50 et en 6 à 8 jours avec 1/100 de c. c. injecté sous la peau.

Par voie rectale, 1/100 de c. c. et souvent même 1/200 de c. c. tuaient ces mêmes animaux en 4 jours, tandis que par voie stomacale les résultats étaient irréguliers : lorsque l'animal avait été maintenu à jeun depuis 24 heures, l'ingestion d'un quart de culture réussissait toujours à les infecter. Mais si leur estomac était plein d'aliments, 94 0/0 survivaient même à l'ingestion d'une demi-culture.

Pour les lapins 1/100 de c. c. de la culture employée tuait par voie intraveineuse et 3 c. c. par ingestion à la sonde stomacale.

B. *Cultures chauffées*. — Le chauffage des cultures destinées aux essais de vaccination a été effectué au bain-marie, en tubes scellés, après agitation convenable pour assurer l'homogénéité de l'émulsion. Avant de les utiliser on prenait toujours soin de s'assurer si elles cultivaient ou non sur gélose.

J'ai pu constater ainsi que les bacilles chauffés 60 minutes à 61-62° sont incapables de déterminer l'infection lorsqu'on les

injecte même à doses massives, tandis qu'un chauffage de 105 minutes à 53°, de 15 minutes à 56° ou de 35 minutes à 50°, ne suffit pas à supprimer leur vitalité et leur virulence.

Les meilleurs résultats de vaccination par voie stomacale ont été obtenus avec des cultures chauffées pendant 90 minutes à 53°. Pourtant à cette température les microbes sont encore vivants et capables de déterminer l'infection chez 10 0/0 des animaux.

I

VACCINATION PAR VOIE STOMACALE

A. Cultures virulentes : 1° *Rats*. — Il arrive fréquemment que les rats blancs survivent à l'ingestion de doses de culture virulente correspondant à 0 c. c. 25, 0 c. c. 30 et 0 c. c. 50 d'émulsion espacées chacune de 12 jours. Mais sur 3 animaux ainsi traités, 2 succombèrent à l'inoculation sous-cutanée d'épreuve en même temps que les témoins, et un seul survécut.

Six rats d'une autre série ont ingéré successivement, à 12 jours d'intervalle, 0 c. c. 25 et 0 c. c. 50 d'émulsion virulente. Trois résistèrent à l'inoculation d'épreuve.

2° *Lapins*. — a) *Lapin* 3,580 grammes. — Résiste à trois ingestions successives de 0 c. c. 1, 0 c. c. 5 et 3 c. c. d'émulsion virulente, respectivement à 6 et 15 jours d'intervalle.

b) *Lapin* 2,500 grammes. — Ingère 0 c. c. 25, 6 jours après 0 c. c. 5 et 15 jours après 2 c. c. Il perd 800 grammes de son poids et se rétablit.

c) *Lapin* 2,000 grammes. — Ingère 0 c. c. 25, 6 jours après 0 c. c. 5 et 25 jours après 5 c. c. Il meurt 6 jours après la dernière ingestion avec des bacilles pesteux dans tous ses organes.

d) *Lapin* 2,300 grammes. — Ingère 1 c. c. d'émulsion, puis 27 jours après 1 c. c. et, 25 jours plus tard, encore 2 c. c. Il succombe 2 mois après la dernière ingestion. Les cultures de la rate et du sang sont négatives. La rate est volumineuse, le foie sclérosé.

e) *Lapin* 2,200 grammes. — Ingère 1 c. c. d'émulsion. On constate qu'il est atteint de paraplégie consécutive à une fracture de la colonne vertébrale dans la région lombaire. Il meurt au bout d'une semaine. Au niveau de la fracture il s'est produit

une hémorragie méningée. Le foie et la rate sont volumineux. La culture du sang est positive.

f) *Lapin 2,100 grammes.* — Ingère 0 c. c. 25 d'émulsion, puis, 21 jours après, 0 c. c. 5, et 11 jours plus tard encore 0 c. c. 5.

Éprouvé 25 jours après la dernière ingestion par 0 c. c. 02 *in veine* en même temps qu'un témoin, il résiste, tandis que le témoin succombe le 3^e jour avec une infection pesteuse généralisée.

g) 4 *lapins* pesant respectivement 2,100 grammes, 1,900, 1,850 et 2,250 ingèrent en même temps, toujours à la sonde, 0 c. c. 25, puis, 18 jours après, 0 c. c. 5 d'émulsion. On les éprouve 35 jours plus tard, en même temps qu'un témoin de 2,150 grammes, par l'inoculation intraveineuse de 0 c. c. 02. Le témoin meurt le 3^e jour. Les quatre autres lapins survivent définitivement.

h) *Lapin 2,000 grammes.* — Ingèrent successivement trois doses de 0 c. c. 5 à 25 et 13 jours d'intervalle. Il est éprouvé une première fois, 22 jours après la dernière ingestion par 0 c. c. 02 *in veine*, et une deuxième fois 10 jours plus tard par 0 c. c. 1 d'émulsion virulente également *in veine*. Le témoin de cette seconde inoculation d'épreuve meurt à la fin du 2^e jour. Le lapin vacciné survit.

i) *Lapin 2,200 grammes.* — Ingère deux doses de 0 c. c. 25 à 8 jours d'intervalle, puis deux doses de 0,5, 21 et 13 jours plus tard. Il est éprouvé comme le précédent à deux reprises par l'inoculation intraveineuse de 0 c. c. 02 et 0 c. c. 1 d'émulsion virulente. Il reste également en bonne santé.

3^o *Cobayes.* — a) *lots de 4 cobayes chacun* ingèrent respectivement deux fois à 12 jours d'intervalle 0 c. c. 01 + 0 c. c. 1; 0 c. c. 02 + 0 c. c. 25; 0 c. c. 1 + 0 c. c. 5. Tous survivent, mais ils succombent à l'inoculation d'épreuve faite 12 jours plus tard avec 0 c. c. 02 sous la peau.

b) 4 *cobayes* ingèrent 0 c. c. 1, 0 c. c. 5, 0 c. c. 1 à 12 jours d'intervalle. Deux succombent infectés par la troisième dose. Les deux survivants ne résistent pas à l'inoculation d'épreuve de 0 c. c. 02 par voie sous-cutanée.

c) 10 *cobayes* ingèrent une seule fois 0 c. c. 25. Quatre d'entre eux succombent. Au bout d'un mois les six survivants ingèrent encore 0 c. c. 02, puis 0 c. c. 50 après 15 jours, et

encore 1 c. c. 15 jours plus tard. Deux seulement résistent à cette dose énorme et un seul supporte sans mourir l'épreuve par 0 c. c. 02 sous la peau.

d) 10 *cobayes* ingèrent 0 c. c. 5 trois fois à 12 jours d'intervalle. L'un a succombé dès après la première ingestion, un autre après la deuxième et deux après la troisième. Deux seulement des six survivants résistent à l'inoculation d'épreuve par 0 c. c. 02 sous la peau.

D'autres expériences sur les *cobayes* montrent qu'en faisant absorber à ces animaux, à 12 jours d'intervalle, trois doses respectives de 0 c. c. 5, 0 c. c. 5 et 1 c. c. d'émulsion virulente, 33 0/0 seulement des animaux ainsi traités résistent à l'inoculation d'épreuve sous-cutanée de 0 c. c. 02, toujours mortelle pour les témoins. C'est le maximum des résultats positifs que j'ai pu obtenir dans mes essais de vaccination par voie stomacale avec les cultures vivantes.

B. *Cultures chauffées à 60° pendant 60 minutes.* — 1° *Rats*. Toutes les tentatives de vaccination par ingestion répétées deux et trois fois à 13 ou 14 jours d'intervalle de 0 c. c. 25, 0 c. c. 50, 1 c. c. et 2 c. c. de culture chauffée ont échoué. Aucun animal n'a résisté à l'épreuve d'inoculation sous-cutanée.

2° *Cobayes*. L'ingestion répétée de 0 c. c. 5, 1 c. c. et 2 c. c. à 10 ou 12 jours d'intervalle ne vaccine pas.

C. *Cultures chauffées à 53° pendant 90 minutes.* — *Cobayes*. 8 *cobayes* ingèrent successivement à 13 jours d'intervalle 0 c. c. 3, 0 c. c. 5 et 0 c. c. 75. Deux succombent à cette période du traitement. Quatre des survivants ingèrent 1 c. c. de culture virulente, non chauffée; ils résistent. Les deux autres, éprouvés par inoculation sous-cutanée, meurent.

D. *Cultures chauffées à 53° pendant 60 minutes, puis cultures virulentes.* — *Cobayes*. 10 *cobayes* ingèrent 0 c. c. 5 de culture chauffée et, 10 jours plus tard, 0 c. c. 25 de culture virulente. Deux succombent après la seconde ingestion. Tous les survivants sont éprouvés par voie sous-cutanée : 3 restent indemnes, 1 meurt 10 jours après le témoin, les autres 1 jour avant ce dernier.

5 *cobayes* ingèrent 0 c. c. 5 de culture chauffée et, 10 jours plus tard, 0 c. c. 25 de culture virulente. Après 14 jours, l'un

est éprouvé par 0 c. c. 02 de culture virulente sous la peau et survit. Après 22 jours, deux autres sont également éprouvés par voie sous-cutanée : ils meurent 14 jours après cette épreuve.

Les deux derniers ingèrent, le 30^e jour, 1 c. c. de culture virulente : un survit, l'autre meurt.

9 cobayes ingèrent 0 c. c. 25 + 0 c. c. 5 de culture chauffée + 0 c. c. 25 de culture virulente à 10 jours d'intervalle. Eprouvés 10 jours plus tard par voie sous-cutanée, 5 sur 9 survivent.

4 cobayes ingèrent 0 c. c. 25 + 0 c. c. 5 + 0 c. c. 5 de culture chauffée + 0 c. c. 01 de culture virulente, à 10 jours d'intervalle. Eprouvés 15 jours plus tard par voie sous-cutanée, tous, sauf un survivent.

E. *Cultures sensibilisées par la méthode de Besredka.* — 4 rats et 25 cobayes qui ont ingéré des microbes préparés suivant la technique indiquée par Besredka et aussi d'autres animaux que nous avons essayé de vacciner par inoculation sous-cutanée de 1 c. c. d'émulsion de ces mêmes microbes sensibilisés ont succombé, sauf deux cobayes seulement, en même temps que les témoins à l'épreuve d'inoculation sous-cutanée virulente.

D'autres expériences ont montré que les cobayes vaccinés par voie sous-cutanée avec des bacilles chauffés et ayant résisté à l'épreuve virulente, peuvent ingérer impunément pendant 3 mois la dose de 0 c. c. 5 de culture virulente répétée tous les 23 jours. 40 jours après la dernière ingestion, ils gardent une solide immunité et résistent dans la proportion de 10 sur 12 à une nouvelle épreuve d'inoculation sous-cutanée virulente (0 c. c. 01 à 0 c. c. 25).

II

VACCINATION PAR VOIE RECTALE

Pour réaliser ces expériences de vaccination par voie rectale, j'ai injecté à des cobayes des émulsions de cultures virulentes ou chauffées dans le rectum au moyen d'une sonde demi-molle très fine introduite sur une longueur de 8 centimètres environ. L'animal était maintenu en position déclive, la tête en bas, pendant 10 minutes après chaque injection. On évite ainsi presque sûrement le rejet du liquide et, lorsque celui-ci est expulsé, il est facile de s'en apercevoir.

Un premier lot de 5 cobayes reçoit ainsi successivement à 10 jours d'intervalle 0 c. c. 25 et 0 c. c. 75 de culture chauffée 60 minutes à 60°. 15 jours plus tard, l'un d'eux est éprouvé par inoculation sous la peau : il succombe.

Les survivants reçoivent encore dans le rectum deux doses de 0 c. c. 75 et 1 c. c. de la même culture chauffée. Après 10 jours ils sont éprouvés par voie sous-cutanée : 2 survivent et 2 meurent.

6 autres cobayes reçoivent dans le rectum 0 c. c. 25, 0 c. c. 75, 0 c. c. 75 et 1 c. c. de culture chauffée 60' à 60° à intervalles de 10 jours. Eprouvés par voie sous-cutanée avec la culture virulente, 4 résistent et 2 contractent la peste.

Des expériences semblables faites par absorption rectale de cultures chauffées à 53° pendant 90 minutes fournissent des résultats encore meilleurs : sur 11 cobayes 1 succombe infecté après la deuxième dose, 1 après la troisième (0 c. c. 5); 5 résistent à l'épreuve par inoculation sous-cutanée et 2 meurent.

Il est donc possible de conférer aux animaux l'immunité contre la peste en introduisant à deux ou trois reprises dans leur rectum des cultures de bacille pesteux atténuées par le chauffage.

III

RÉACTION DE BORDET-GENGOU CHEZ LES VACCINÉS

Je me suis proposé de rechercher à l'aide de cette réaction :

1° Si, dans le sérum des animaux immunisés par les voies sous-cutanée, gastrique ou rectale, on peut obtenir la déviation de l'alexine ou complément ;

2° Si cette réaction persiste lorsque l'immunité tend à disparaître ;

3° A quelle période de l'immunisation commencent à apparaître les anticorps ;

4° Enfin si, chez les animaux traités mais qui ne résistaient pas à l'épreuve d'inoculation sous-cutanée, il ne se forme pas d'anticorps décelables dans le sérum.

J'ai employé comme sérum hémolytique du sérum de lapins

traités par injections intrapéritonéales de sang de chèvre défilbriné et lavé.

L'antigène était fourni par des cultures de bacille pesteux sur gélose, âgées de 24 heures, tenues à la température du laboratoire et émulsionnées à raison de 15 c. c. d'eau physiologique par tube.

L'alexine était empruntée au sérum frais de cobaye.

Dans une première série, j'ai réuni les animaux vaccinés par différentes voies et qui ont été saignés à l'acmé de la période d'immunisation ou dans la phase de décroissance.

Je les divise en deux groupes :

A. — Cobayes soumis avant la saignée à l'épreuve d'inoculation sous-cutanée virulente.

B. — Cobayes non éprouvés avant la saignée.

A. — 1^o Cobaye vacciné par voie stomacale avec cultures virulentes, puis éprouvé par voie sous-cutanée. Saigné 14 jours après l'épreuve :

Antigène.	Anticorps.	Alexine.	Sérum hémolyt.	Hémolyse.
0 c. c. 5	0 c. c. 5	0 c. c. 1	0 c. c. 1	—
0,5	0,1	0,1	0,1	—
0,5	0,05	0,1	0,1	—
0,5	0,01	0,1	0,1	—
0,5	0,005	0,1	0,1	+

2^o Cobaye vacciné par voie stomacale avec deux doses successives de culture virulente. Eprouvé par voie sous-cutanée. Saigné 28 jours après l'épreuve :

Antigène.	Anticorps.	Alexine.	Sérum hémolyt.	Hémolyse.
0,5	0,5	0,1	0,1	—
0,5	0,2	0,1	0,1	—
0,5	0,1	0,1	0,1	—
0,5	0,05	0,1	0,1	+

B. — 1^o Cobaye vacciné par voie rectale avec cultures chauffées 60' à 60°, non éprouvé par voie sous-cutanée : saigné 15 jours après la dernière injection rectale :

Antigène.	Anticorps	Alexine.	Sérum hémolyt.	Hémolyse.
0,5	0,5	0,1	0,1	—
0,5	0,2	0,1	0,1	—
0,5	0,1	0,1	0,1	—
0,5	0,05	0,1	0,1	—

2^o Lapin vacciné par voie stomacale avec trois doses successives de cultures virulentes. Non éprouvé par voie sous-cutanée. Saigné 15 jours après la dernière injection :

Antigène.	Anticorps.	Alexine.	Sérum hémolyt.	Hémolyse.
0,5	0,5	0,1	0,1	—
0,5	0,2	0,1	0,1	—
0,5	0,1	0,1	0,1	—
0,5	0,05	0,1	0,1	—

3^o Lapin vacciné comme le précédent. Non éprouvé par voie sous-cutanée. Saigné 5 mois après la dernière ingestion virulente :

Antigène.	Anticorps.	Alexine.	Sérum hémolyt.	Hémolyse
0,5	0,5	0,1	0,1	—
0,5	0,2	0,1	0,1	—
0,5	0,1	0,1	0,1	—
0,5	0,05	0,1	0,1	+

Dans une deuxième série d'expériences, j'ai saigné des cobayes 48 heures après la dernière ingestion vaccinale. La réaction de *Bordet-Gengou* a montré la fixation de l'alexine sur

les bacilles pesteux avec des doses de sérum (anticorps) de 0 c. c. 4, alors même que l'animal n'avait ingéré qu'une seule fois ou n'avait reçu qu'une seule fois par voie rectale des bacilles chauffés à 53° pendant 90 minutes.

Les anticorps apparaissent donc très rapidement dans le sérum des animaux auxquels on fait ingérer des cultures de peste, soit virulentes, à petites doses, soit atténuées par le chauffage, alors même que ces animaux sont incapables de résister à l'inoculation d'épreuve par voie sous-cutanée.

IV

MESURE DE L'INDEX OPSONIQUE CHEZ LES VACCINÉS

J'ai employé pour ces déterminations la méthode que j'ai pu étudier au laboratoire de *Saint-Mary's Hospital*, à Londres, grâce à l'obligeance du professeur *Wright*, auquel j'adresse mes meilleurs remerciements pour l'excellent accueil qu'il a bien voulu me faire pendant les quelques jours que j'ai passés auprès de lui.

Les sérums étalons dont je me suis servi étaient des sérums normaux de cobaye et de lapin. Le dénombrement des bacilles phagocytés fut effectué dans tous les cas sur 100 leucocytes.

Les résultats obtenus dans chaque expérience sont résumés dans le tableau suivant :

ANIMAUX	MODE DE VACCINATION	Date de la prise du sang après la dernière injection ou ingestion virulente.	INDEX OPSONIQUE
Cobaye.	Voie stomacale cultures virulentes, épreuve sous-cutanée.	7 jours.	2,8
id.	id.	id.	2,6
id.	id.	id.	2,6
Cobaye.	Voie rectale — cultures chauffée + 53°.	4 jours.	3,8
id.	id.	id.	3,8
id.	id.	id.	2,4
id.	id.	id.	0,8 (+ mort).
id.	id.	id.	3,6
Lapin.	Voie stomacale culture virulente.	3 jours.	2,2
id.	id.	id.	3,2
id.	id.	id.	0,5 (très souffrant au moment de la prise de sang + mort).
COBAYE	Voie rectale cult. chauffée 53° × 90°.	Prise du sang après la 1 ^{re} injec.	INDEX OPSONIQUE
	0,25	3 jours.	0,7
	0,25	id.	0,7
	Culture 53° × 103,	id.	—
	0,50	id.	0,6
	0,25	id.	0,7
	0,25	id.	0,9

J'ai étudié comparativement les variations du pouvoir opsonique chez 5 lapins vaccinés par voie stomacale par ingestions de cultures virulentes et éprouvés la veille par injection intraveineuse de 0 c. c. 01 de culture virulente, sauf le dernier (n° 5) qui fut éprouvé par inoculation intraveineuse de 0,02. L'index opsonique d'un témoin inoculé avec 0,01 fut également mesuré.

Voici les résultats de cette expérience :

INDEX OPSONIQUE

Dates.	Témoins.	Vaccinés.				
		N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5
15 /2 08	0,37	2,4	4,8	4,0	3,0	4,3
16 »	0,35	2,4	4,8	4,1	3,6	4,4
17 »	0,38	2,5	4,6	4,9	0,95	2,7
18 »		1	2,7	2	4,6	2,4
19 »		4,4				
20 »		4,2				2,7
21 »		0,98				
22 »						4,2
23 »						4,0

Aucune phase négative n'a été observée chez les vaccinés tandis que celle-ci fut très accusée chez le témoin qui mourut le 3^e jour.

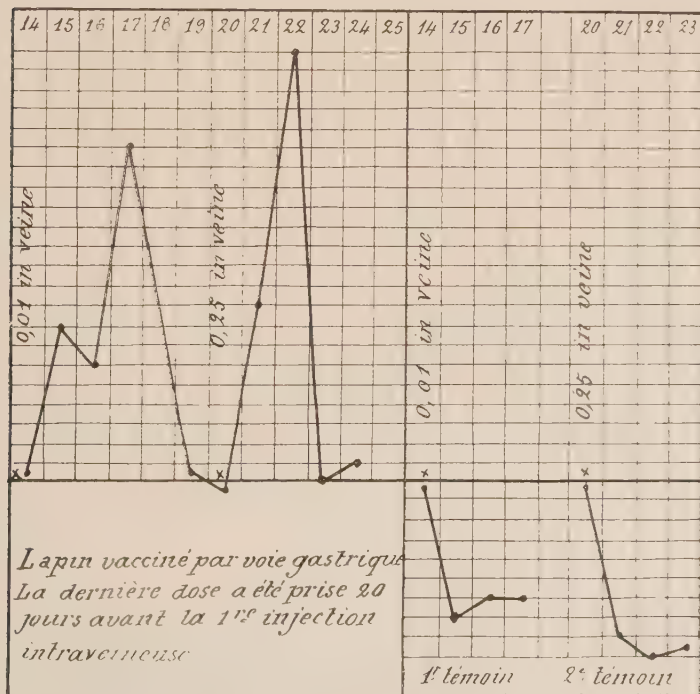
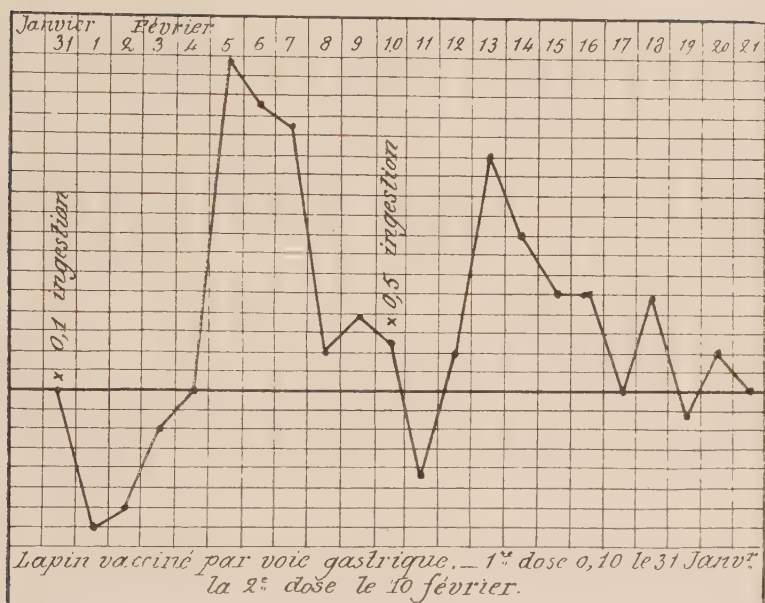
Je reproduis ci-après les courbes opsoniques :

1^o D'un lapin qui a ingéré successivement deux doses de culture virulente;

2^o D'un lapin déjà vacciné par voie stomacale et auquel j'ai injecté dans les veines 0 c. c. 25 de culture virulente;

3^o D'un lapin témoin qui a reçu la même injection intra-veineuse.

Ces expériences, et d'autres que je crois inutile de rapporter me permettent de conclure qu'après la première dose de virus ingérée, le pouvoir opsonisant subit une phase négative. Cette phase est proportionnelle à la quantité de virus ingérée. Elle fait défaut et apparaît à peine chez les animaux déjà vaccinés.



V

RÉACTION SPÉCIFIQUE DE L'INTESTIN CHEZ LES ANIMAUX VACCINÉS

Lorsqu'on fait ingérer aux cobayes ou aux rats soit des cultures virulentes, soit des cultures chauffées à doses mortelles, ou lorsqu'on injecte ces cultures soit par voie rectale, soit par voie sous-cutanée, on ne constate jamais de réaction spéciale de l'intestin. Les animaux succombent alors à la septicémie pesteuse, sans que la muqueuse intestinale présente aucun aspect particulier.

Par contre, si l'on injecte sous la peau des doses mortelles de virus pesteux à des animaux précédemment traités en vue d'obtenir la vaccination par la voie stomacale ou rectale, à l'aide de cultures virulentes ou de cultures atténuées par le chauffage, on constate *toujours* chez ces animaux l'apparition d'une réaction congestive de l'intestin tout à fait caractéristique. Cette réaction se manifeste par une rougeur intense, couleur lie de vin, de tout l'intestin grêle, avec entérite hémorragique à laquelle le gros intestin participe souvent, et éruption de petits tubercules miliaires sur toute la surface de ces organes. Souvent même on trouve un épanchement de sérosité sanguinolente dans le péritoine.

Ces lésions s'observent avec la plus grande régularité chez tous les animaux insuffisamment vaccinés qui succombent à l'épreuve par inoculation du virus sous la peau. Dans aucune de mes expériences elle n'a manqué. Je n'essaierai pas pour le moment d'expliquer sa genèse et je me borne à signaler sa constance vraiment remarquable. Elle fait immédiatement penser à la réaction spécifique que présentent les muqueuses chez les tuberculeux lorsqu'on vient à les imprégner de tuberculine (ophtalmo-réation et réaction rectale de Calmette).

VI

VIRULENCE DES DÉJECTIONS DES ANIMAUX VACCINÉS CONTRE LA PESTE PAR
LES VOIES DIGESTIVES

La méthode de vaccination étudiée dans le cours de ce travail ne saurait évidemment avoir quelque intérêt pratique

que s'il était démontré que les déjections des sujets qui ont ingéré des cultures virulentes ou atténuées de bacilles pesteux sont inoffensives. Il était donc indispensable de préciser ce point.

Des expériences préliminaires sur des animaux non immunisés montrèrent que, dans tous les cas, les selles évacuées moins de 48 heures après l'ingestion de bacilles vivants sont virulentes pour la souris : elles fournissent toujours des inoculations positives.

Lorsqu'on expérimente dans les mêmes conditions avec les selles d'un animal vacciné par les voies digestives et ayant résisté à l'inoculation d'épreuve par voie sous-cutanée, on constate au contraire que les déjections ne renferment presque jamais de bacilles pesteux :

Un *cobaye* vacciné par ingestion de cultures chauffées puis virulentes, fut éprouvé par injection sous la peau de 0 c. c. 5 de culture virulente. 20 jours après, l'animal absorbe à la sonde un tiers de culture sur gélose. On recueille séparément toutes les déjections évacuées pendant 48 heures. Celles-ci, émulsionnées avec de l'eau physiologique, sont inoculées sous la peau de 6 souris blanches : aucune ne prend la peste.

Dans une autre expérience identiquement conduite, une seule souris sur 6 succomba : son sang renfermait le bacille pesteux.

Bien que les microbes de la peste soient ordinairement détruits dans l'intestin des animaux vaccinés, puisque les déjections de ces derniers sont virulentes jusqu'au moment où l'immunité est obtenue, on doit donc veiller avec le plus grand soin à leur désinfection : et comme il ne paraît pas possible de conférer l'immunité par l'ingestion ou par l'inoculation rectale de cultures mortes, on ne saurait songer à créer artificiellement, chez l'homme ou chez les animaux sensibles à la peste, l'état réfractaire par l'absorption intestinale de bacilles pesteux même atténués par le chauffage.

CONCLUSIONS

1° On peut conférer au *cobaye* et au lapin l'immunité contre la peste en faisant ingérer à ces animaux soit de petites doses successives de bacilles virulents, soit des cultures chauffées à

53° pendant 90 minutes. Les deux tiers des animaux ainsi préparés résistent à l'épreuve d'inoculation sous-cutanée sûrement mortelle par les témoins;

2° On peut plus facilement encore conférer l'immunité par injections rectales plusieurs fois répétées de bacilles chauffés, puis virulents;

3° Avec l'une ou l'autre méthode, les ingestions ou injections doivent être espacées chacune de 10 à 14 jours;

4° Chez les animaux vaccinés par l'intestin (estomac ou rectum) on voit apparaître très rapidement les anticorps spécifiques dans le sang. Ceux-ci sont mis en évidence par la réaction de *Bordet-Gengou*;

5° L'index opsonique reste toujours plus élevé chez les mêmes animaux que chez les témoins après une injection virulente, sous-cutanée ou intraveineuse;

6° Les animaux vaccinés par ingestion ou par injection rectale présentent, lorsqu'ils viennent à succomber à l'épreuve par inoculation sous-cutanée de virus pesteux, une réaction congestive très caractéristique de l'intestin;

7° Les bacilles pesteux ingérés sont presque complètement détruits dans le tube digestif des animaux vaccinés.

En terminant ce travail je considère comme un devoir d'exprimer toute ma gratitude à M. le professeur *Calmette* pour l'hospitalité si bienveillante qu'il m'a accordée dans son laboratoire et pour les conseils toujours si précieux qu'il m'a prodigués.

ERRATA

Mémoire de M. Edmond Sergent: Études sur la fièvre méditerranéenne.

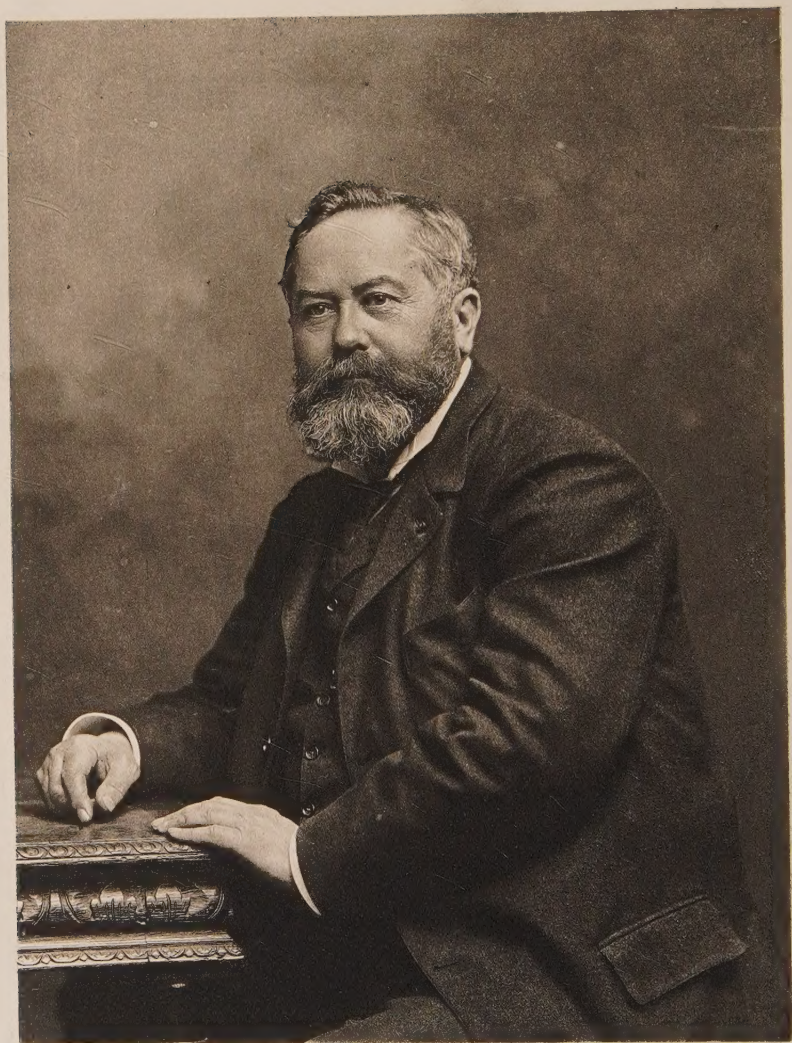
Page 227. — Légende, lire : courbe du singe neuf, n° 32.

Page 230. — Légende, lire : courbe du singe, n° 44, dans ce graphique l'agglutination doit être marquée + à partir du 10 août.

Page 232. — Légende, lire : courbe du singe, n° 48.

Le Gérant : G. MASSON.

Seeaux. — Imprimerie Charaire.



CHARLES CHAMBERLAND

1851 - 1908

Héliog Dujardin.

Phot Pierre Petit